



**Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC**  
**Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - PPGCA**

NINA GABRIELA SILVA GUALBERTO

**AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA METAGENÔMICA DE PLACA  
SUBGENGIVAL EM CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL TRATADOS COM  
GEL ODONTOLÓGICO VETERINÁRIO**

Ilhéus – BA

2022

NINA GABRIELA SILVA GUALBERTO

AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA METAGENÔMICA DE PLACA  
SUBGENGIVAL EM CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL TRATADOS COM  
GEL ODONTOLÓGICO VETERINÁRIO

Tese apresentada à Universidade Estadual de  
Santa Cruz, como parte das exigências para  
obtenção do título de doutora em Ciência  
Animal.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Santiago Alberto Carlos

Ilhéus – Bahia

2022

G899

Gualberto, Nina Gabriela Silva.

Avaliação bacteriológica metagenômica de placa subgengival em cães com doença periodontal tratados com gel odontológico veterinário / Nina Gabriela Silva Gualberto. – Ilhéus, BA: UESC, 2022. xiii, 94f. : il.; anexos.

Orientadora: Renata Santiago Alberto Carlos  
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCA.

Inclui referências.

1. Boca – Microbiologia. 2. Genômica. 3. Odontologia veterinária. 4. Sequenciamento de nucleotídeo. I. Título.

CDD 616.31

NINA GABRIELA SILVA GUALBERTO

AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA METAGENÔMICA DE PLACA  
SUBGENGIVAL EM CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL TRATADOS COM  
GEL ODONTOLÓGICO VETERINÁRIO

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Renata Santiago Alberto Carlos - Dra. UESC/ DCAA (Orientadora)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Paula Elisa Brandão Guedes - UESC/ DCAA

---

Prof. Dr. Juliano Oliveira Santana – Pitágoras/ DCH

---

Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani- UESC/ DCB

---

Prof. Dr. Deusdete Conceição Gomes Júnior- UFOB/ DCAA

Ilhéus – Bahia

2022

A vida não é fácil e nunca será, mas  
você é a razão da minha força de  
vontade de lutar e nunca desistir  
À minha filha Alícia...

Dedico!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, criador de todas as coisas, escritor da minha história, que me deu forças para chegar até aqui, cuja presença se faz constante em minha vida.

À minha filha Alícia, o amor da minha vida.

À minha avó Mary, eu não seria o que sou hoje se não fosse por você.

À minha mãe Cyda e meu padrasto Joel que me incentivam constantemente.

Ao meu pai David e minha madrasta Cristina por todo amor e apoio.

Ao Danilo por seu amor, dedicação, apoio, incentivo, por seu meu parceiro e melhor amigo.

Aos meus irmãos Mauro, Jessé, Ruth, Silvia por todo carinho e amor.

Aos meus sobrinhos Luna, Ian, Rhavi, Levi, Cecília, João, Júlia e Yasmin (in memorian) pois me fizeram conhecer o amor de tia.

Aos meus tios Paulo, Eliane, Mônica, Elias (in memorian), André, Aline, Abraão, Camila, Rute, Gilvan, Ana, Teresa e Zezé por todo carinho.

Aos meus primos amados Thaís, Aline, Gabriel, Daniel, Juliano, Geovani, Davi, Lilian, Esther, Miguel, Emilie, Alice, mas em especial a John meu parceiro da vida toda, ajudador e companheiro por todas as madrugadas me ajudando a fazer meus gráficos e escrever os resultados.

Aos meus amigos Suzana, Suellen, Ingrid, Rodrigo, Alba, Júnior, Kamiri, Matheus, Isabella, Beatriz, Luciana, Carolaine, Priscilla, Michel, Jeverton, Gisele, Tayná, Milena, Camila e Geovanna agradeço a Deus por tê-los em minha vida.

Aos meus amigos e colegas da clínica Casa do Bicho por todos os momentos de trabalho e diversão.

Aos colegas de doutorado Joana, Jeane, William, em especial a Mirian por sua amizade, carinho e apoio e Camille (in memorian), sempre me lembrarei de sua força e coragem.

Aos professores e funcionários do PPGCA por toda ajuda que recebi.

Ao Juliano Santana por sua excelente orientação.

À Paula Brandão por sua amizade de tantos anos e toda ajuda que tenho recebido.

À minha orientadora Renata Santiago, além de ser excelente como orientadora, também é mãe dos seus alunos, é sempre uma honra ter você ao meu lado, obrigada por tudo!

Aos meus dogs Fred e Alvin por serem meus companheirinhos.

Aos tutores dos animais, amigos e colaboradores do meu trabalho que direta ou indiretamente me ajudaram ao longo dessa caminhada.

Aos animais que me fizeram optar por escolher essa profissão tão nobre!

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Cão com a cavidade oral saudável.....	18
<b>Figura 2:</b> Cão no estágio I da doença periodontal, apresentando: A- gengivite leve; B- Deposição de cálculos dentários .....	18
<b>Figura 3:</b> Cão no estágio II da doença periodontal, apresentado: A – Gengivite moderada; B-Deposição de cálculos dentários; C- Início da retração gengival. ....	19
<b>Figura 4:</b> Cão no estágio III da doença periodontal, apresentando: A - Retração gengival; B- Início da exposição da furca; C- Deposição em maior quantidade de cálculos dentários .....	20
<b>Figura 5:</b> Cão no estágio IV da doença periodontal, apresentando: A- Retração gengival; B; C- Exposição da furca e deposição de cálculos dentários.....	20
<b>Figura 6:</b> Sondagem do dente canino com sonda periodontal milimetrada para classificação do estágio da DP .....	42
<b>Figura 7:</b> Placa de 96 poços acoplada a uma placa magnética durante a purificação das bibliotecas. ....	45
<b>Figura 8:</b> Gráfico com curvas de rarefação demonstrando riqueza de espécies distribuídas para 12 amostras dos grupos experimentais controle, leve, moderado e grave, antes do tratamento (CSG, LSG, MSG, GSG), 30 dias de tratamento (C1G, L1G, M1G, G1G) e 60 dias de tratamento (C2G, L2G, M2G, G2G) .....	50
<b>Figura 9:</b> Porcentagem dos filos bacterianos predominantes identificados nos três tempos antes, 30 e 60 dias após tratamento dos grupos A) controle; B) leve; C) moderado e D) grave. Outros representam os filos encontrados em proporções menores (1% e < 1%)......	52
<b>Figura 10:</b> Quantidade de gêneros identificados no grupo controle, leve, moderado e grave antes do tratamento, 30 e 60 dias após o tratamento .....	53
<b>Figura 11.</b> Proporção das espécies de bactérias dentro do gênero <i>Porphyromonas</i> em cada grupo e em cada período analisado .....	57
<b>Figura 12:</b> Proporção das espécies de bactérias dentro do gênero <i>Bacteroides</i> em cada grupo e em cada período analisado.....	58



<b>Figura 13:</b> Proporção das espécies de bactérias dentro do gênero <i>Moraxella</i> em cada grupo e em cada período analisado.....	59
<b>Figura 14:</b> Proporção das espécies de bactérias dentro do gênero <i>Treponema</i> em cada grupo e em cada período analisado.....	59
<b>Figura 15:</b> Box-plot das porcentagens das espécies nos três períodos avaliados e valores de p das análises estatísticas comparativas (paramétrica: ANOVA e não paramétrica: Mann-Whitney) .....	60
<b>Figura 16:</b> Porcentagens das espécies encontradas nos três tempos do grupo controle. Dia 0: corresponde a antes do tratamento, Dia 30: um mês e Dia 60: dois meses após o tratamento .....	61
<b>Figura 17:</b> Porcentagens das espécies encontradas nos três tempos do grupo com periodontite leve. Dia 0: corresponde a antes do tratamento, Dia 30: um mês e Dia 60: dois meses após o tratamento.....	62
<b>Figura 18:</b> Porcentagens das espécies encontradas nos três tempos do grupo com periodontite moderada. Dia 0: corresponde a antes do tratamento, Dia 30: um mês e Dia 60: dois meses após o tratamento.....	63
<b>Figura 19:</b> Porcentagens das espécies encontradas nos três tempos do grupo com periodontite grave. Dia 0: corresponde a antes do tratamento; Dia 30: um mês e Dia 60: dois meses após o tratamento.....	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01.</b> Divisão dos grupos experimentais para realização do pool.....	43
<b>Tabela 02.</b> Oligonucleotídeos universais utilizados na reação de PCR.....	44
<b>Tabela 03.</b> Index selecionados pelo software MiSeq Control v2.6.....	46
<b>Tabela 04.</b> Total de reads e porcentagem por amostra no sequenciamento.....	49
<b>Tabela 05.</b> Reads das OTUs dos gêneros mais abundantes identificados na boca de cães com gengiva saudável, DP leve, moderada e grave através do sequenciamento, antes do tratamento e com 30 e 60 dias pós tratamento.....	54
<b>Tabela 06.</b> Presença das espécies de bactérias com seus respectivos gêneros e filos em cada grupo avaliado.....	56

## SUMÁRIO

RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. Introdução.....	14
2. Revisão de Literatura.....	16
2.1 Doença Periodontal em Cães.....	16
2.1.1 Estágios da Doença Periodontal.....	17
2.1.2 Etiopatogenia.....	21
2.1.3 Tratamento .....	23
2.1.4 Profilaxia e Prevenção.....	24
2.2 Metagenômica .....	27
2.2.1 Gene 16S ribossomal (16S RNAr).....	27
2.2.2 Sequenciamento de Nova Geração - Next Generation Sequencing (NGS) ...	28
2.2.2.1 Plataforma Illumina® – Sistema MiSeq .....	29
2.2.3 Detecção do microbioma oral de cães com NGS.....	30
2.3 Ações das bactérias na cavidade oral .....	32
2.3.1 <i>Fusobacterium nucleatum</i> .....	32
2.3.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	33
2.3.3 <i>Begeryella zoohelcum e Capnocytophaga spp.</i> .....	34
2.3.4 <i>Treponema denticola</i> .....	35
2.3.5 <i>Desulfomicrobium orale</i> .....	36
2.3.6 <i>Clostridium difficile</i> .....	37
2.3.7 <i>Bacteroides sp.</i> .....	37
2.3.8 <i>Pasteurella multocida</i> .....	38
2.3.9 <i>Aminobacterium colombiense</i> .....	39
3. Objetivos.....	40
3.1 Objetivo Geral .....	40
3.2 Objetivos Específicos.....	40
4. Material e Métodos.....	41
4.1 Considerações éticas .....	41
4.2 Local de realização do projeto .....	41
4.3 Animais participantes do projeto.....	41
4.4 Classificação da doença periodontal e delineamento experimental .....	42

4.5 Coleta de material para análises .....	42
4.6 Tratamento com Tropiclean Fresh Breath Clean Teeth Gel® .....	43
4.7 Preparação dos pools e divisão dos grupos .....	43
4.8 Extração de DNA .....	43
4.9 Preparação das bibliotecas de DNA .....	44
4.9.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	44
4.9.2 Purificação.....	44
4.9.3 Index.....	45
4.9.4 Quantificação das bibliotecas - RT-qPCR .....	46
4.9.5 Sequenciamento .....	47
4.10 Bioinformática.....	47
4.11 Análise estatística.....	48
4.11.1 Comparação entre os gêneros de cada grupo .....	48
4.11.2 Comparação do efeito do tratamento .....	48
5. Resultados.....	49
5.1 Cães participantes do estudo .....	49
5.2 Qualidade do Sequenciamento .....	49
5.3 Análise da população bacteriana .....	51
5.4 Comparação entre os grupos experimentais de tratamento .....	55
6. Discussão.....	66
Conclusão.....	73
Referências.....	74
ANEXOS .....	92

## RESUMO

O microbioma oral é composto por uma variedade de bactérias que estão presentes tanto na cavidade oral saudável, como nos estágios mais avançados da doença periodontal (DP). O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade bacteriana da placa subgengival de 40 cães antes e após tratamento com gel odontológico veterinário, divididos em quatro grupos experimentais com 10 animais cada: cavidade oral saudável (G1), periodontite leve (G2), moderada (G3) e grave (G4), através de análises metagenômicas. Foram coletadas placas bacterianas dos dentes superiores de todos os animais antes do tratamento, 30 dias e 60 dias após o início do tratamento com o gel *Tropiclean Fresh Breath Clean Teeth Gel*® que contém *Aloe vera* e chá verde. Após extração de DNA e preparação de bibliotecas bacterianas, foi realizado o sequenciamento de amplicons das regiões V3-V4 do gene rRNA 16S pela plataforma Illumina MiSeq. Através do sequenciamento e auxílio da bioinformática, foram identificados 16 gêneros de bactérias, em todos os grupos de tratamento, pertencentes aos filos Bacteroidetes, (*Porphyromonas* sp., *Bacteroides* sp., *Capnocytophaga* sp., *Bergeyella* sp., e *Barnesiella* sp.), Firmicutes (*Clostridium* sp.), Fusobacteria (*Fusobacterium* sp. e *Cavibacter* sp.), Proteobacteria (*Moraxella* sp., *Desulfomicrobium* sp., *Neisseria* sp. *Campylobacter* sp. e *Pasteurella* sp.), Synergistetes (*Aminobacterium* sp.), Espiroquetas (*Treponema* sp.), e Tenericutes (*Acholeplasma* sp.). Observou-se que o número de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) não apresentou modificações em termos de filos e gêneros, mas modificou em relação às espécies, sendo encontrada maior proporção nos grupos de cães com periodontite crônica, do que nos grupos controle e leve. Concluiu-se que as análises metagenômicas foram satisfatórias para identificação de diferentes OTUs na cavidade oral de cães nas diferentes fases da doença periodontal. O uso do gel não alterou no número de OTUs relacionadas ao gênero e espécies identificadas em cada grupo, antes do tratamento, 30 e 60 dias após o tratamento.

**Palavras-chave:** Bactérias orais. Metagenômica. Odontologia Veterinária. Sequenciamento.

## ABSTRACT

The oral microbiome is composed of a variety of bacteria that are present both in the healthy oral cavity and in the more advanced stages of periodontal disease (PD). The aim of this study was to evaluate the bacterial diversity of the subgingival plaque of 40 dogs before and after treatment with veterinary dental gel, divided into four experimental groups with 10 animals each: healthy oral cavity (G1), mild periodontitis (G2), *moderate* (G3) and severe (G4), through metagenomic analyses. Bacterial plaques were collected from *the* upper teeth of all animals before treatment, 30 days and 60 days after starting treatment with *Tropiclean Fresh Breath Clean Teeth Gel*® containing *Aloe vera* and green tea. After DNA extraction and preparation of bacterial libraries, amplicons were sequenced from the V3-V4 regions of the 16S rRNA gene using the Illumina MiSeq platform. Through sequencing and the aid of bioinformatics, 16 genus of bacteria were identified, in all treatment groups, belonging to the phyla Bacteroidetes, (*Porphyromonas* sp., *Bacteroides* sp., *Capnocytophaga* sp., *Bergeyella* sp., and *Barnesiella* sp.), Firmicutes (*Clostridium* sp.), Fusobacteria (*Fusobacterium* sp. and *Cavibacter* sp.), Proteobacteria (*Moraxella* sp., *Desulfomicrobium* sp., *Neisseria* sp. *Campylobacter* sp. and *Pasteurella* sp.), Synergistetes (*Aminobacterium* sp.), Spirochetes (*Treponema* sp.), and Tenericutes (*Acholeplasma* sp.). It was observed that the number of Operational Taxonomic Units (OTUs) did not show changes in terms of phyla and genera, but changed in relation to species, with a higher proportion being found in the groups of dogs with chronic periodontitis than in the control and mild groups. It was concluded that the metagenomic analyzes were satisfactory for the identification of different OTUs in the oral cavity of dogs at different stages of periodontal disease. The use of the gel did not change the number of OTUs related to the genus and species identified in each group, before treatment, 30 and 60 days after treatment.

**Keywords:** Oral bacteria. Metagenomics. Veterinary Dentistry. Sequencing.

## 1. Introdução

A doença periodontal é a afecção oral de maior prevalência entre os animais de companhia, afetando até 80% dos cães acima de quatro anos em graus variados (RIGGIO et al., 2011). Ela causa grande impacto por ser uma doença inflamatória crônica que afeta as estruturas da gengiva e do periodonto, componentes de sustentação dos dentes; possui origem multifatorial e é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de várias doenças sistêmicas (RADEEROM et al., 2018).

Quando se realiza diagnóstico precoce e tratamento odontológico adequado, é possível evitar que a doença se desenvolva e se agrave, promovendo assim, qualidade de vida aos animais acometidos (PEREIRA DOS SANTOS et al., 2019). O tratamento da doença periodontal tem como objetivo remover a placa bacteriana e o cálculo dentário através da raspagem dos dentes, podendo ser utilizados instrumentos odontológicos manuais ou mecânicos. Entretanto, não apenas o tratamento, mas a prevenção é de extrema importância para retardar nova formação do biofilme que é o fator primário para o desenvolvimento da doença (SANTOS; CARLOS; ALBUQUERQUE, 2012).

A placa dentária é formada pela aderência de microrganismos ao dente, que inicialmente são bactérias gram-positivas imóveis. Essa população bacteriana presente na placa, por falta de higiene oral, atrai bactérias patogênicas gram-negativas e anaeróbicas (XU; GUNSOLEY, 2014). Porém, a microbiota oral de cães sempre foi investigada de forma inadequada, pois eram utilizados métodos de cultura para esses estudos, que não são eficientes para detectar grandes populações bacterianas (DEWHIRST et al., 2012; DAVIS et al., 2013).

As novas técnicas de diagnóstico moleculares vêm sendo bastante utilizadas para detectar e analisar sequências de genomas, com custos mais reduzidos, por permitirem realizar o sequenciamento de populações bacterianas com maior facilidade e em menor intervalo de tempo (DAVIS et al., 2013). Essas novas metodologias consistem em utilizar o DNA genômico total, extraído diretamente do ambiente que se deseja estudar e através da PCR realiza-se as amplificações (SANTANA et al., 2018).

Estudos metagenômicos geralmente são efetuados para analisar sequências de genes bacterianos RNA ribossomal 16S (rRNA 16S), identificando espécies importantes para o desenvolvimento da doença periodontal (RIGGIO et al., 2011). Os resultados obtidos pela plataforma illumina produzem elevado número de sequências, porém por suas

leituras de sequências serem curtas para o estudo de comunidades microbianas, esses resultados ficam limitados. Surgiu então, a plataforma MiSeq, que fornece informações taxonômicas mais precisas e confiáveis de comunidades microbianas complexas e para isso, utiliza-se primers específicos pré-definidos do genoma para as regiões V3-V4 do rRNA 16S (JEON et al., 2015).

Para caracterizar populações microbianas diretamente de qualquer amostra ambiental, as tecnologias de sequenciamento de nova geração são associadas à bioinformática e estatística para análises complexas. Através das técnicas moleculares é possível identificar e atribuir nomes científicos a microrganismos não cultiváveis, cuja intenção é fornecer informações sobre o agente etiológico que causa uma doença infecciosa, e possivelmente desenvolver fármacos antimicrobianos eficazes (DAVIS et al., 2013).

Com o avanço dos estudos sobre a odontologia veterinária e com o objetivo de realizar o tratamento e prevenção da doença periodontal sem a necessidade de anestesia geral, produtos odontológicos foram desenvolvidos. Um gel odontológico veterinário à base de *Aloe Vera* e chá verde, plantas que possuem ação bactericida, anti-inflamatória e cicatrizante, utilizado em estudos anteriores em cães com cálculos dentários, foi eficaz para o tratamento e prevenção do desenvolvimento da doença periodontal (GUALBERTO et al., 2022). Porém até o momento não foram realizados experimentos controlados para avaliar como o produto interfere na população bacteriana, impedindo assim, o desenvolvimento da doença periodontal.

O objetivo desse estudo foi avaliar e caracterizar a diversidade bacteriana da placa subgingival de cães com gengiva saudável e com doença periodontal leve, moderada e grave, antes e após tratamento de 30 e 60 dias com gel odontológico veterinário à base de *Aloe vera* e chá verde, utilizando o sequenciamento de amplicons de rRNA 16S, através de análises metagenômicas.



## 2. Revisão de Literatura

### 2.1 Doença Periodontal em Cães

A doença periodontal é uma inflamação que acomete os tecidos de sustentação do dente, decorrente da deposição de placa bacteriana nesse local observada predominantemente em animais acima de três anos de idade (FERNANDES et al., 2012). A fisiopatogenia envolve o acometimento do dente e do periodonto, que desempenham a função de sustentação e proteção dos dentes na cavidade oral, sendo composto pela gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar (RAMOS et al., 2011; FERNANDES et al., 2012).

A doença periodontal é a afecção mais comum da cavidade oral dos cães e gatos e, acomete cerca de 80% desses animais (PEREIRA DOS SANTOS et al., 2019). Possui origem inflamatória, crônica e infecciosa, que causa destruição dos tecidos que promovem proteção e sustentação dos dentes, sendo classificada como gengivite, processo reversível da doença periodontal, ou como periodontite, fase irreversível (MARSHALL et al., 2014; STELLA et al., 2018).

A doença periodontal é influenciada por diversos fatores predisponentes relacionados ao indivíduo e ao ambiente, que associados ao biofilme dentário, promovem seu desenvolvimento (RIGGIO, et al., 2011; RAMOS et al., 2011; PEREIRA DOS SANTOS et al., 2019). Dentre os principais fatores podem ser citados: a idade, em que os animais mais velhos apresentam o estágio mais avançado; a raça, pois são mais acometidos os animais de pequeno porte (FERNANDES et al., 2012; WALLIS, et al., 2015); a anatomia dentária; os hábitos mastigatórios; a falta de higiene oral (RAMOS et al., 2011); o tipo de dieta e a consistência do alimento, pois o alimento seco (ração), devido à sua ação mecânica, é considerado mais eficaz na manutenção da saúde da cavidade oral quando comparado ao alimento úmido (ROCHA; CASTRO, 2018); a presença de dentes decíduos, assim como a má oclusão dentária, que auxiliam na formação do biofilme (SEMEDO-LEMSADDEK et al., 2016; STELLA et al., 2018).

Quanto aos sinais clínicos, os mais observados são: halitose, edema, sangramento, formação de bolsas periodontais e início da deposição de cálculos dentários. Com a evolução da gengivite para a periodontite, ocorre intensificação da inflamação oral, levando à perda de inserção dentária, perda óssea, recessão gengival e perda do dente

devido o afrouxamento dos ligamentos periodontais. Além desses sinais, os animais acometidos podem apresentar também espirros, secreções nasais, exposição de furcas, fístulas orais, abscessos dentários, fraturas patológicas, alterações comportamentais e dificuldade em se alimentar devido à dor (FERNANDES et al., 2012; PEREIRA DOS SANTOS et al., 2019).

Alguns estudos relacionam a doença periodontal grave com o desenvolvimento de doenças sistêmicas, pois a corrente sanguínea leva bactérias e endotoxinas para outros órgãos e tecidos, causando diversas lesões (PAVLICA et al., 2008; FERNANDES et al., 2012; PEREIRA DOS SANTOS et al., 2019). Dentre as alterações associadas à doença periodontal em cães estão a endocardite bacteriana (PAVLICA et al., 2008; SEMEDO-LEMSADDEK et al., 2016), diabetes mellitus secundária, relacionada ao fato de a doença periodontal causar resistência à insulina, alterações renais como a glomerulonefrite (PEREIRA DOS SANTOS et al., 2019), pneumonia e hepatite (FERNANDES et al., 2012; FRANÇA et al., 2017; STELLA et al., 2018).

O diagnóstico é obtido através de exame clínico para avaliar e identificar a presença dos sinais clínicos já descritos (RAMOS et al., 2011; FERNANDES et al., 2012). Para isso, deve ser realizada a sondagem periodontal em que a sonda milimetrada é inserida no sulco gengival, em torno dos dentes até encontrar resistência. Através da profundidade da sonda é possível verificar se o paciente tem a cavidade oral saudável, ou a periodontite podendo ser classificados em estágio leve, moderado e severo (MARSHALL et al., 2014; AMERICAN VETERINARY DENTAL COLLEGE, 2016). A radiografia, por sua vez, é utilizada como exame complementar, que permite avaliar as estruturas ósseas dos dentes e periodonto, sendo sua principal função avaliar a perda óssea e determinar em que estágio se encontra o paciente com periodontite (SANTOS; CARLOS; ALBUQUERQUE, 2012; WALLIS et al., 2021).

### **2.1.1 Estágios da Doença Periodontal**

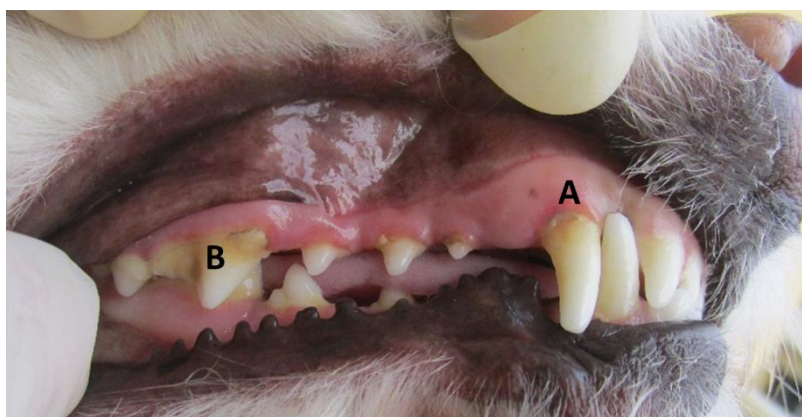
A doença periodontal apresenta quatro estágios diferentes, que podem ser classificados de acordo com os sinais clínicos apresentados e alterações radiográficas observadas. A identificação do estágio da doença se torna fundamental para que o tratamento adequado seja instituído (PEREIRA DOS SANTOS et al., 2019).

O animal com a cavidade oral saudável (Figura 1), apresenta gengiva rosada, pouca ou nenhuma deposição de biofilme e ausência da formação de bolsas periodontais (AMERICAN VETERINARY DENTAL COLLEGE, 2016). No estágio I da doença periodontal (Figura 2), sinais como inflamação gengival leve, formação de placa bacteriana na superfície dentária, mucosa avermelhada e halitose poderão ser observados. É uma fase reversível, porém o tratamento correto deve ser instaurado para que não ocorra avanço da afecção (CARREIRA et al., 2015; AMERICAN VETERINARY DENTAL COLLEGE, 2016; PEREIRA DOS SANTOS et al., 2019).



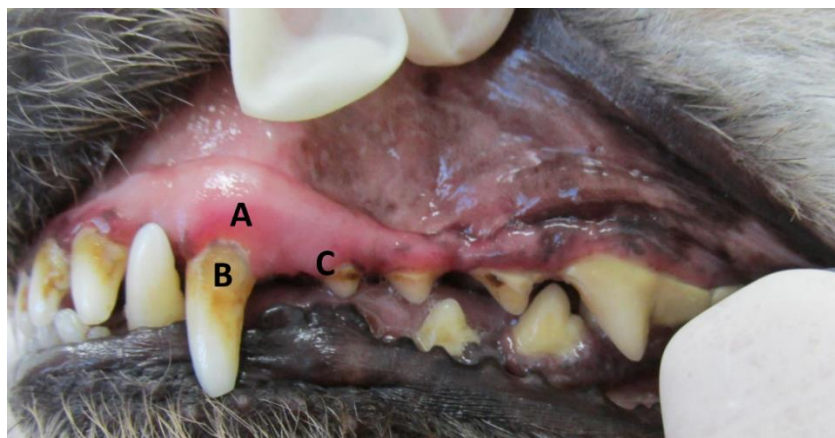
**Figura 1:** Cão com a cavidade oral saudável.

Fonte: Arquivo pessoal.



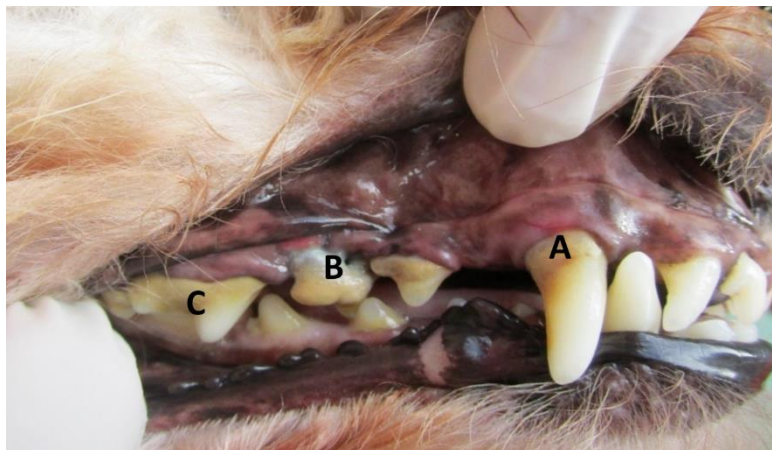
**Figura 2:** Cão no estágio I da doença periodontal, apresentando: A- gengivite leve; B- Deposição de cálculos dentários. Fonte: Arquivo pessoal.

No estágio II (Figura 3), os pacientes apresentam periodontite leve, dor e halitose, presença de placa bacteriana e cálculos dentários em maior quantidade. Pelo fato de ainda não ter ocorrido exposição da raiz, ao ser submetido ao tratamento adequado, o quadro poderá ser revertido (AMERICAN VETERINARY DENTAL COLLEGE, 2016; PEREIRA DOS SANTOS et al., 2019).



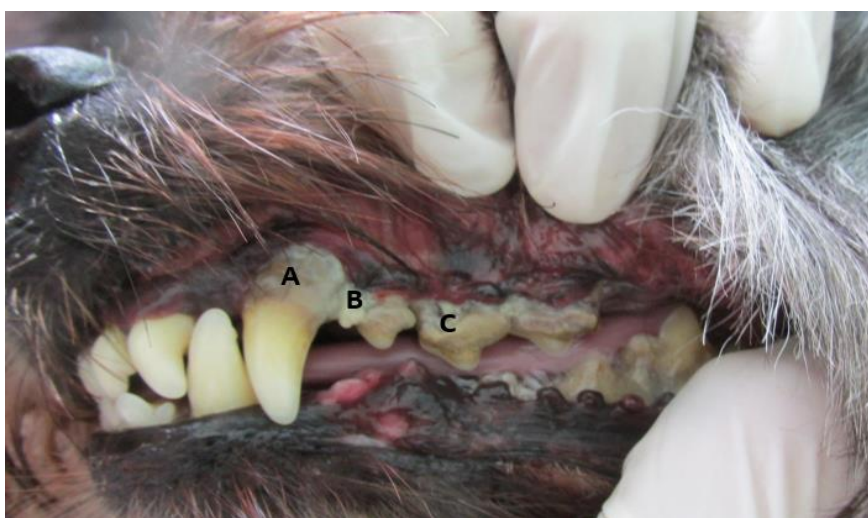
**Figura 3:** Cão no estágio II da doença periodontal, apresentado: A – Gengivite moderada; B- Deposição de cálculos dentários; C- Início da retração gengival. Fonte: Arquivo pessoal.

No estágio III (Figura 4), fase já irreversível, observa-se uma periodontite moderada, o paciente apresentará sangramento, intensa deposição de cálculos dentários, dor e recusa em se alimentar com dieta sólida, além de mudanças de comportamento (PEREIRA DOS SANTOS et al., 2019). Esse quadro ainda provocará perda de inserção dentária, retração gengival e formação de bolsas periodontais com aproximadamente quatro milímetros de profundidade (AMERICAN VETERINARY DENTAL COLLEGE, 2016).



**Figura 4:** Cão no estágio III da doença periodontal, apresentando: A – Retração gengival; B- Início da exposição da furca; C- Deposição de cálculos dentários. Fonte: Arquivo pessoal.

No quarto e último estágio (Figura 5), ocorre uma infecção bacteriana crônica. O paciente apresentará grave inflamação na gengiva, bolsas periodontais profundas, intensa retração gengival, exposição de furca, entre outros sinais (PEREIRA DOS SANTOS et al., 2019). Nessa fase, que geralmente é observada em pacientes mais idosos, muitos deles já apresentam outras doenças sistêmicas que podem estar associadas à bacteremia (AMERICAN VETERINARY DENTAL COLLEGE, 2016).



**Figura 5:** Cão no estágio IV da doença periodontal, apresentando: A- Retração gengival; B; C- Exposição da furca e deposição de cálculos dentários. Fonte: Arquivo pessoal.

### 2.1.2 Etiopatogenia

Os dentes ficam em contato com fluido próprio da cavidade bucal, que contém grande variedade de microrganismos. Após a erupção, ocorre o desenvolvimento do biofilme dentário que contém diversas espécies de bactérias (principalmente aeróbias), partículas de alimentos, saliva, células epiteliais e inflamatórias, substâncias inorgânicas, além de minerais como cálcio, magnésio e fósforo (ADEPU et al., 2018).

A etapa inicial para o desenvolvimento do biofilme se dá a partir da adesão de microrganismos, que se acumulam em poucas horas na superfície dos dentes. Inicialmente as bactérias aeróbicas gram-positivas imóveis se depositam sobre os dentes e tecidos moles adjacentes formando um biofilme entre 24 a 48 horas (HOLCOMBE et al., 2014). Com a ausência de higiene oral, esses microrganismos atraem bactérias anaeróbicas gram-negativas móveis, podendo resultar em gengivite entre 10 e 21 dias (MARSHAL et al., 2014; XU; GUNSOLLEY, 2014).

As bactérias na superfície dentária se organizam na forma de colônias que são envoltas na matriz extracelular. Esse ambiente permite o suprimento de nutrientes e impede a deposição de metabólitos tóxicos, promovendo proteção, fazendo com que as bactérias desenvolvam resistência aos antibióticos e aos antissépticos (FONSECA et al., 2011; FERNANDES et al., 2012).

A placa bacteriana é formada por massa densa, de material pegajoso e amarelado, aderido à superfície dos dentes e dos cálculos dentários, não calcificado e resistente, tendo como origem principal a colonização e o crescimento de bactérias e outros microrganismos como micoplasmas, leveduras, vírus e protozoários (SANTOS; CARLOS; ALBUQUERQUE, 2012; PINTO et al., 2020).

A placa supragengival por estar depositada acima da gengiva e da superfície dos dentes é mais suscetível aos processos abrasivos da mastigação e limpeza oral, sendo removida facilmente. Já a placa subgengival está mais protegida, pois se desenvolve na região do sulco gengival e das bolsas periodontais. Independente da localização, o biofilme sofre mineralização devido à presença de cálcio e outros minerais oriundos da saliva, facilitando a deposição de cálculos dentários (SANTOS; CARLOS; ALBUQUERQUE, 2012; PEREIRA DOS SANTOS et al., 2019; PINTO et al., 2020).

Assim, a doença periodontal surge a partir de infecção bacteriana dos tecidos periodontais, causando gengivite e periodontite. A gengivite é um processo inflamatório que afeta apenas o tecido mole e não se estende às outras estruturas do periodonto, sendo



uma fase reversível após a remoção da placa bacteriana. Já a periodontite é a inflamação que acomete o osso alveolar, o ligamento periodontal e o cimento, ocasionando a perda dentária, sendo considerada irreversível (FONSECA et al., 2011; FERNANDES et al., 2012; XU; GUNSOLLEY, 2014).

Nos estágios iniciais da doença periodontal, a placa supragengival favorece o crescimento de bactérias patogênicas por reduzir a disponibilidade de oxigênio. Após a formação da bolsa periodontal, a placa supragengival não exerce mais essa influência, pois o ambiente se torna ideal para a proliferação dos microrganismos que agredem o periodonto (XU; GUNSOLLEY, 2014; PEREIRA DOS SANTOS et al., 2019).

Mais de 750 espécies de bactérias estão presentes na cavidade oral, porém a identificação é dificultada pelo fato de muitas delas não serem cultiváveis. Por fornecerem uma grande quantidade de informações e apresentarem menor custo, diversos estudos descreveram resultados em que as tecnologias de nova geração (NGS) foram utilizadas para detectar os microrganismos presentes na cavidade oral tanto de cães saudáveis, como de cães com doença periodontal (DEWHIRST et al., 2012; DAVIS et al., 2013).

De modo geral, os filos de bactérias predominantes encontradas em todas as fases da doença periodontal são os Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria e Fusobacteria e Espiroquetas (STURGEON et al., 2013; MCDONALD et al., 2016; OBA et al., 2021). Já os gêneros e espécies são bastante diversificados. Em cães com gengiva saudável geralmente foram identificados os gêneros: *Moraxella* sp., *Capnocytophaga* sp., *Bergeyella* (*B. zoohelcum*), *Neisseria* (em particular *N. shayeganii*), e as famílias Porphyromonadaceae e Pasteurellaceae (RIGGIO et al., 2011; DAVIS et al., 2013; HOLCOMBRE et al., 2014, WALLIS et al., 2015; WALLIS et al., 2021).

Oba et al. (2021) realizaram estudo sobre o microbioma da placa subgengival e supragengival em cães saudáveis e detectaram os gêneros *Paludibacter*, *Filifactor*, *Peptostreptococcus*, *Fusibacter*, *Anaerovorax*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Desulfomicrobium* nas amostras subgengivais, enquanto *Capnocytopaga*, *Lampropedia*, *Leucobacter*, *Euzebya*, *Bergeyella*, *Lautropia*, *Desulfobulbus*, *Enhydrobacter*, *Moraxella*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, foram predominantes nas amostras supragengivais.

Em cães com gengivite predominaram os gêneros: *Porphyromonas cangingivalis*, *Moraxella* sp., *Bergeyella zoohelcum*, *Neisseria shayeganii*, Pasteurellaceae sp., *Capnocytophaga* sp. Em animais com periodontite foram identificadas bactérias da família *Porphyromonas* sp. Peptostreptococcaceae spp., bem

como *Lachnospiraceae* sp., *Clostridiales* sp., *Peptococcus* sp. e *Corynebacterium canis*, *Helococcus* sp., *Fusobacterium* sp., *Filifactor* sp. (RIGGIO et al., 2011; DAVIS et al., 2013; WALLIS et al., 2015; WALLIS et al., 2021). Já os gêneros *Moraxella* sp., *Bergeyella*, *Actinobacteria* e *Neisseria* diminuiram à medida que aumentava o grau da doença periodontal (WALLIS et al., 2015).

Em contraste ao que é relatado em humanos, em cães com gengivas saudáveis foram encontradas em maior proporção as espécies bacterianas Gram negativas aeróbicas, enquanto as Gram positivas anaeróbicas predominaram em cães com doença periodontal, servindo como um indicador da aproximação da periodontite em cães (DAVIS et al., 2013; MCDONALD et al., 2016; WALLIS et al., 2015; OBA et al., 2021).

Holcombe et al. (2014) afirmaram que todas as bactérias Gram negativas detectadas em cães com gengiva saudáveis, têm uma tendência oposta à placa humana em que geralmente são detectadas Gram positivas aeróbicas. De acordo com Wallis et al. (2021), as espécies bacterianas pertencentes ao filo Firmicutes aumentam conforme o estágio da doença periodontal se agrava.

### **2.1.3 Tratamento**

O tratamento periodontal cirúrgico pode ser instituído em qualquer estágio da periodontite, sendo necessário realizar administração prévia de antibióticos em animais que tenham estágio avançado da doença periodontal com a intenção de reduzir a carga bacteriana (FONSECA et al., 2011). A limpeza periodontal deve ser realizada apenas com o animal devidamente anestesiado e consiste em vários procedimentos que devem ser realizados em conjunto (SANTOS; CARLOS; ALBUQUERQUE, 2012).

Para o tratamento cirúrgico deve ser realizada a raspagem completa dos cálculos sub e supragengivais, aplainamento radicular e extração dentária quando for necessário, com a finalidade de reduzir a infecção. Os instrumentos odontológicos manuais mais utilizados são as curetas do tipo Gracey, After-five e Mini-five; já o aparelho de ultrassom, que tem ação mecânica, deve permanecer no máximo entre dez e vinte segundos em cada dente, pois o uso incorreto pode causar lesões significativas (SANTOS; CARLOS; ALBUQUERQUE, 2012; HOLCOMBE et al., 2014).

O polimento é realizado após a remoção total do cálculo, utilizando em conjunto com a pasta profilática. Ele tem por objetivo tornar a superfície dentária mais lisa



possível, dificultando assim, a formação de novas placas bacterianas (HOLCOMBRE et al., 2014). O aplainamento radicular serve para alisar a raiz exposta do dente, restaurar os tecidos adjacentes, cujo objetivo é evitar a aderência de nova placa bacteriana, retardando o surgimento de nova infecção (FERNANDES et al., 2012; SANTOS; CARLOS; ALBUQUERQUE, 2012).

A terapia com antibióticos geralmente é iniciada três dias antes do procedimento cirúrgico e deve ter continuação nos sete dias subsequentes. A função dos antibióticos é reduzir a inflamação, o sangramento provocado pela raspagem e ajudar a reduzir a carga microbiana. Esses medicamentos não devem ser administrados como terapia única e os mais recomendados são: clindamicina, metronidazol, espiramicina, ciprofloxacina, doxiciclina e a tetraciclina (FONSECA et al., 2011).

A melhor forma de reduzir o desenvolvimento da doença periodontal é através da higienização oral, sendo utilizados métodos físicos como escovação dentária, fornecimento de brinquedos e petiscos mastigáveis e dietas a base de alimentos duros, que exercitam o periodonto e retardam o desenvolvimento da doença periodontal pela ação mecânica nos dentes, bem como produtos variados que, aplicados diretamente sobre os dentes, têm como objetivo reduzir a deposição de novo biofilme (SANTOS; CARLOS; ALBUQUERQUE, 2012; BLOOR, 2015).

#### **2.1.4 Profilaxia e Prevenção**

Após a limpeza dentária novo biofilme começa a se formar entre 24 e 48 horas (HOLCOMBE et al., 2014). Assim, para controlar nova deposição da placa bacteriana, a escovação dentária é o método mais indicado e deve ser realizada três vezes por semana em animais que foram submetidos ao tratamento periodontal (LIMA et al., 2004).

Entretanto, muitos tutores, por não disponibilizarem de tempo para realizar a escovação rotineira em seus animais, buscam alternativas que podem ser utilizadas como métodos preventivos, como o fornecimento de brinquedos e petiscos mastigáveis que exercitam o periodonto (PINTO et al., 2008). Além disso, podem utilizar aditivos na alimentação animal, como o hexametáfosfato e o tripolifosfato de sódio, que reduzem significativamente o acúmulo de cálculos dentários (PINTO et al., 2008; BLOOR, 2015).

Em seu estudo, Castro; Rocha (2018) afirmaram que a alimentação do animal com ração seca é melhor para auxiliar no controle do desenvolvimento da doença periodontal,

entretanto, Bloor (2015) e Gualberto et al. (2022) relataram que não houve influência da alimentação úmida comparada à alimentação seca, levando a concluir que a alimentação isolada não tem efeito se não for associada a algum tipo de prevenção.

Alguns produtos de uso veterinário contendo soluções antiplaca são indicados para auxílio no tratamento e na prevenção no desenvolvimento de biofilmes e deposição de cálculos dentários, a exemplo da clorexidina 0,12%, citado como o fármaco mais eficaz em combater as bactérias que formam a placa (SANTOS, CARLOS, ALBUQUERQUE, 2012). Esse antisséptico também é bastante recomendado por ter sua ação potencializada após a remoção cirúrgica de cálculos dentários, pois possui baixa toxicidade quando utilizado no tratamento odontológico e é um agente efetivo na inibição de novo biofilme bacteriano (ZANATTA et al., 2007).

Entre as vantagens do uso da clorexidina, podem ser citadas o fato de não provocar resistência bacteriana, além da capacidade de atuar por até 12 horas (ZANATTA et al., 2007). Entretanto, o seu uso por tempo prolongado também provoca o aparecimento de manchas verdes, acastanhadas ou enegrecidas nos dentes dos animais e alteração da sensação gustativa, que podem desaparecer após a suspensão do uso do produto (GUPTA et al., 2014).

O Conselho Veterinário de Saúde Oral (Veterinary Oral Health Council - VOHC) confere selo de aceitação a produtos cuja função é retardar ou inibir a formação de placa bacteriana e acúmulo de cálculos dentários nos animais (WALLIS; HOLCOMBE, 2020). Assim, substâncias fitoterápicas com potente atividade antimicrobiana, que combatem o desenvolvimento de biofilme e que têm efeitos colaterais reduzidos, são interessantes para a odontologia (KHAN et al., 2020).

Cada vez mais, produtos fitoterápicos geralmente utilizados na odontologia humana, têm sido adaptados para uso animal. Um gel odontológico veterinário, à base de Aloe vera e *Camellia sinensis* (chá verde) ao ser utilizado como método preventivo e por tempo prolongado, promoveu retardo da deposição da placa bacteriana e de cálculos dentários sem necessidade de escovação dentária em cães (GUALBERTO et al., 2022).

De acordo com Silva et al., (2021), a *Aloe vera* possui ação antibactericida, cicatrizante e anti-inflamatória e apresenta efeitos contra a deposição de placa e inflamação gengival. Lee et al., (2012) realizaram testes *in vitro* de um creme dental com gel de *Aloe vera* que inibiu o crescimento microbiano presente na boca de cães com doença periodontal.

Portanto, ao analisar produtos odontológicos contendo *Aloe vera* algumas vantagens observadas no estudo de Silva et al., (2021) foram o efeito contra a gengivite, periodontite, controle do crescimento da placa bacteriana, cura de lesões na mucosa oral e redução da dor na cavidade oral. Além disso, podem ser utilizados com segurança e sem causar efeitos colaterais quando comparados à clorexidina, tendo as ações antibacteriana e anti-inflamatória comprovadas, que contribuem para uma boa saúde oral (SILVA et al., 2021).

Dentre as diversas plantas estudadas para aplicação na odontologia, a *Camellia sinensis*, popularmente conhecida como chá verde, se destaca por conter EGCg (*Epigallocatequina galato*), principal constituinte das catequinas do chá verde e responsável pelos efeitos antioxidante e antimicrobiano da planta (YODA et al., 2015). De acordo com Lindinger (2016), o chá verde também possui efeitos anti-inflamatórios, anti-angiogênicos e anti-carcinogênico e contribui para a prevenção e o tratamento da doença periodontal, além de ter contribuído significativamente para reduzir a halitose (KHAN et al., 2019).

Khan et al., (2019) realizaram um estudo testando diferentes concentrações do extrato de *C. sinensis*, em que o mesmo apresentou efeito inibitório contra bactérias gram positivas e negativas, observando também que ao aumentar a concentração do extrato, sua ação contra o fungo *Candida albicans* se potencializava. Já Rojas; Ganoza (2020) verificaram ação contra o *Streptococcus mutans*, com um pico máximo desse efeito em 24 horas. Outros autores afirmam um efeito antimicrobiano sobre as bactérias *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella* ssp. que estão presentes na placa dentária, entre outras (KHAN et al., 2019).

O chá verde também é rico em polifenóis que podem ser utilizados em alimentos para impedir que o biofilme dentário seja formado, pois possuem ação bacteriostática por ter propriedades antioxidantes. Estudos realizados por Hambire et al. (2015) comparando o chá verde e o gluconato de clorexidina demonstraram que ambos apresentaram eficácia antiplaca ao serem usados por um período de 14 dias, porém o chá verde apresentou melhor sabor e nenhum efeito colateral.

## **2.2 Metagenômica**

De acordo com as evidências, a maioria dos microrganismos presentes em diversos ambientes não são cultiváveis. Ao analisar a biodiversidade bacteriana, muitas informações podem não ser obtidas, pois apenas 1% desses microrganismos pode ser cultivados em placas (MENECHINE et al., 2015).

Com o avanço da ciência e com o objetivo de preservar o DNA microbiano para obter informações sobre biodiversidade, genética e fisiologia, surgiram novas técnicas moleculares, utilizadas para analisar os microrganismos nos ambientes, sem a necessidade de cultivá-los (HUSON, et al., 2007; MENECHINE et al., 2015). Assim, a metagenômica além de permitir alcançar esses objetivos, oferece também a oportunidade de descobrir e analisar genes desconhecidos (MARTINS et al., 2013).

A metagenômica consiste em investigar diferentes moléculas de DNA de uma vasta comunidade microbiológica de determinado ambiente, possibilitando analisar todos os genomas, garantindo que estes sejam sequenciados em grande escala e de uma só vez (SANTANA et al., 2018). Assim, através das informações adquiridas, pode-se determinar a taxonomia de uma população, verificando quais são os microrganismos mais predominantes no ambiente estudado (O'BRIEN, 2016).

### **2.2.1 Gene 16S ribossomal (16S RNAr)**

A análise do gene 16S RNA ribossômico bacteriano é uma das técnicas moleculares mais utilizadas para identificar microrganismos desconhecidos, permitindo a caracterização de novos patógenos e bactérias não cultiváveis (MCDONALD et al., 2016). Por conter regiões variáveis e conservadas, ele é utilizado para comparar todas as bactérias, determinando as características genéticas entre os organismos (ABAYASEKARA et al., 2017).

A sequência do gene 16S rRNA possui aproximadamente 1.550 bp de comprimento. Entretanto, seu sequenciamento geralmente só é realizado quando se deseja encontrar uma nova espécie bacteriana. Dessa forma, na maioria das vezes, a sequência inicial de 500 pb, além de ser suficiente para identificar a diferença filogenética entre as cepas, também é mais barata e de fácil execução laboratorial (ABAYASEKARA et al., 2017).

O gene 16S rRNA se tornou um padrão para detecção de comunidades microbiológicas. Ele é subdividido em nove regiões distintas (V1 a V9) que são geneticamente variáveis. Para isso, utilizam-se iniciadores universais, estando as regiões V2 e V3 diretamente relacionadas à taxonomia bacteriana, classificando-as em relação ao gênero e à espécie (LUNDBERG et al., 2013).

Para analisar a diversidade microbiológica, os bancos de dados, possuem milhões de sequências de nucleotídeos depositadas, muitas destas relacionadas ao gene 16S rRNA, possibilitando a comparação das cepas desconhecidas com as bactérias descritas anteriormente (AHMAD et al., 2021).

Atualmente para analisar e processar os dados do RNAr 16S gerados através do sequenciamento, utilizam-se ferramentas de bioinformática, como o Qiime (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) e o pipeline do Uparse que agrupam as sequências em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) para que as análises da diversidade sejam realizadas (ALLALI et al., 2017; RODRIGUES et al., 2017).

### **2.2.2 Sequenciamento de Nova Geração - Next Generation Sequencing (NGS)**

Estudos metagenômicos são utilizados para a identificação da microbiota presente em determinados ambientes. Com o desenvolvimento das novas tecnologias de sequenciamento de DNA, essas informações ficaram mais acessíveis devido à possibilidade de gerar uma grande leitura sobre comunidades bacterianas complexas (HUSON et al., 2007). Para isso, realiza-se a extração de DNA total de uma população para construir bibliotecas microbiológicas, o que possibilita a avaliação completa de uma região codificadora de um ou vários genes ao mesmo tempo em uma única reação, ampliando a avaliação taxonômica das amostras (METZKER, 2010; LIU et al., 2012).

De 1977 até o final de 1990, eram utilizadas as técnicas de sequenciamento Sanger chamada de tecnologia de "primeira geração". Contudo, apesar de grandes conquistas, como por exemplo, o sequenciamento completo do genoma humano (HGP – Human Genome Project), a aplicação dessa técnica era limitada, demorada e cara. Por esse motivo, surgiu a necessidade de desenvolver novas tecnologias para realizar sequenciamentos de forma mais precisa, rápida e mais barata (METZKER, 2010).

Dessa forma, as novas plataformas desenvolvidas, ficaram conhecidas como sequenciadores de nova geração (NGS), ou de “segunda geração”, que começaram a ser comercializadas em 2005 e evoluíram rapidamente por utilizarem equipamentos com

capacidade de sequenciar milhões ou bilhões de bases em apenas uma corrida (LIU et al., 2012).

A primeira plataforma de NGS desenvolvida foi a 454 FLX (Roche). Em seguida a Solexa (Illumina), a SOLiD (Applied Biosystems) e a Heliscope (tSMS) (Helicos) foram desenvolvidas. Conhecidas como sequenciadores de terceira geração estão: PacBio (Pacific Bioscience) e a Nanopore (Oxford Nanopore Technologies). Por fim, Ion Torrent da Life Technologies é considerada um sequenciador de quarta geração (METZKER, 2010). Entretanto, a Illumina é a plataforma mais utilizada atualmente (JEON et al., 2015).

### **2.2.2.1 Plataforma Illumina® – Sistema MiSeq**

Utilizando o sequenciador da Illumina (Miseq) é possível obter rapidamente informações e caracterizar a taxonomia de uma comunidade microbiana em alta resolução. Comparado ao pirosequenciamento, o Illumina garante maior cobertura de sequenciamento, com redução de custos e produz menor taxa de erros. Por outro lado, ao produzir sequências mais curtas, a leitura taxonômica se torna mais complexa (JEON et al., 2015).

A plataforma Illumina® (Solexa) foi desenvolvida pelas empresas: Solexa, Lynx Therapeutics, Manteia Predictive Medicine e Illumina, que se basearam na metodologia de Turcatti et al. (2008). Assim, surgiu o sequenciador *Illumina Genome Analyser*. Semelhante ao método de Sanger, a metodologia se baseia na síntese de uma fita complementar ao DNA alvo utilizando DNA polimerase e nucleotídeos terminadores, que possui diferentes fluoróforos. A fluorescência é emitida quando os nucleotídeos se ligam à fita e ao final é registrada uma imagem que após ser decodificada, revela a sequência de interesse (LIU et al., 2012).

O sequenciador Illumina realiza a amplificação em PCR em fase sólida por ponte, que promove clonagens in vitro dos fragmentos, criando *clusters*, que geram milhões de cópias do mesmo fragmento de DNA (TURCATTI et al., 2008). A flowcell é a superfície de clonagem dividida em oito regiões conhecidas como linhas ou canais com capacidade para realizar o sequenciamento de várias amostras. Para diferenciá-las é necessário adicionar adaptadores diferentes para cada uma delas. Em cada linha da flowcell, os adaptadores são fixados pela extremidade 5', deixando livre a extremidade 3' para que os oligonucleotídeos se liguem à fita de DNA. Podem ser produzidos até 50 milhões de

clusters por linha, indicando uma excelente representação da biblioteca. O número de amostras a serem sequenciadas, em uma corrida, depende da cobertura que se deseja obter (TURCATTI et al., 2008; JEON et al., 2015).

O MiSeq é recomendado para utilização em laboratórios menores por ser um aparelho de bancada versátil, com capacidade de realizar todas as etapas do processo no mesmo aparelho, que inclui a leitura e a análise de dados. Uma de suas aplicações relevantes é o sequenciamento de amplicons (LIU et al., 2012). Como limitações essa plataforma pode realizar leitura de fragmentos muito grandes, que geram sequências de baixa qualidade nas extremidades do fragmento, porém o tipo de erro dominante desta plataforma é a substituição de nucleotídeos (LIU et al., 2012; JEON et al., 2015).

O sistema MiSeq pode produzir de 250 a 300 pb de reads pareadas em uma única corrida. Pelo fato de se conhecer a distância que separa uma read da outra, pode-se alinhar as sequências e é possível detectar variações durante o sequenciamento. O sistema MiSeq pode produzir aproximadamente de 13,2 a 15 Gb de dados em 56 horas. Embora o tamanho das reads sejam considerados pequenos, o Illumina MiSeq é um dos sequenciadores mais flexíveis e de melhor rendimento, pois é capaz de gerar grande quantidade de dados, resultando em informações taxonômicas mais precisas e confiáveis (TURCATTI et al., 2008; JEON et al., 2015; ILLUMINA, 2021).

### **2.2.3 Detecção do microbioma oral de cães com NGS**

Nos últimos anos, muitas técnicas moleculares, mesmo com algumas limitações, começaram a ser utilizadas com a finalidade de investigar as bactérias não cultiváveis presentes na cavidade oral humana (WALLIS et al., 2021). Essas técnicas se estenderam para uso veterinário, ampliando as informações sobre muitos microrganismos que começaram a ser analisados através do uso das tecnologias de segunda de geração (NGS) sem necessidade de realizar a cultura bacteriana (RIGGIO et al., 2011; DEWHIRST et al., 2012). As tecnologias NGS mais utilizadas para investigar as bactérias presentes na cavidade oral são: Roche 454 para pirosequenciamento, Illumina HiSeq ou MiSeq, ABI SOLiD e Ion Torrent (METZKER, 2010; XU; GUNSOLLEY, 2014).

O uso das novas tecnologias permite utilizar duas abordagens de análise diferentes. A primeira é a técnica de Shotgun, que "fragmenta" e "lê" todo o DNA em uma amostra, detectando vírus, bactérias e parasitas. A segunda abordagem tem uma meta definida e utiliza o gene rRNA 16s, para analisar o conjunto de genes funcionais. A

aplicação dessas técnicas contribuiu para esclarecer alguns aspectos cruciais do microbioma oral (XU; GUNSOLLEY, 2014).

O primeiro estudo a usar métodos independente de cultura para identificar bactérias da cavidade oral de cães foi realizado por Riggio et al., (2011). O objetivo era identificar as bactérias associadas com gengivite e periodontite e compará-las com a flora oral em cavidades saudáveis. As amostras foram submetidas à cultura bacteriana de rotina, encontrando tanto em cães com gengivas saudáveis, quanto com gengivite e periodontite, bactérias não cultivadas (12,5% dos isolados). Ao realizar o sequenciamento do gene 16S rRNA, as espécies identificadas foram: *Pseudomonas* sp. (30,9%) em cães saudáveis, *Porphyromonas cangingivalis* (16,1%) em animais com gengivite e *Desulfomicrobium orale* (12,0%) em cães com periodontite.

Ao utilizar o pirosequenciamento de alto rendimento do gene rRNA 16S para examinar o microbioma oral de seis cães saudáveis, Sturgeon et al. (2013) detectaram os filos Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes, Fusobacteria e Espiroquetas. Os gêneros mais identificados foram *Porphyromonas* (39,2%), *Fusobacterium* (4,5%), *Capnocytophaga* (3,8%), *Derxia* (3,7%), *Moraxella* (3,3%) e *Bergeyella* (2,7%). Além disso, também foram detectadas bactérias com potencial zoonótico em todos os cães, sugerindo que a cavidade oral dos caninos abriga uma comunidade bacteriana rica e diversa.

Davis et al. (2013) coletaram amostras da placa subgengival de 223 cães com gengiva saudável, com gengivite e periodontite leve. Realizou-se o pirosequenciamento dos amplicons identificando um total de 274 unidades taxonômicas após análise bioinformática e estatística. Verificou-se que *Porphyromonas* assim como *Moraxella* e *Bergeyella* foram os gêneros encontrados em todos os estágios da doença, inclusive nos animais com cavidade oral saudável. Na periodontite leve foram identificadas bactérias dos gêneros *Peptostreptococcus*, *Actinomyces* e *Peptostreptococcaceae*.

Analisando a composição bacteriana em cálculos dentários de cães e gatos, Radeerom et al., (2018) realizaram sequenciamento de 16S rRNA (regiões hipervariáveis V3 e V4) utilizando a plataforma Illumina. O número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) identificadas nos três grupos do estudo, foi de 180 em cães de raças grandes, 190 em cães de raças pequenas não braquicefálicas e 150 em cães de raças pequenas braquicefálicas. Em gatos foram identificados 111 OTUs. No cálculo dentário



de cães e gatos, o filo Firmicutes teve a maior proporção especialmente a classe Clostridia.

Uma pesquisa realizada por Wallis et al. (2015) teve como objetivo identificar as alterações que ocorrem nas comunidades bacterianas subgengivais durante a transição da gengivite leve para os estágios iniciais da periodontite. Amostras de placa subgengival foram coletadas dos dentes de 52 cães Schnauzer miniatura a cada seis semanas por 60 semanas. Utilizando o pirosequenciamento 454 do rDNA 16S, foi detectado um grupo de espécies aeróbias Gram negativas, incluindo *Bergeyella zoohelcum*, *Moraxella* sp. Pasteurellaceae sp. e *Neisseria shayeganii*, durante a gengivite. Essas bactérias foram diminuindo proporcionalmente à medida que os animais desenvolviam periodontite leve. Porém, particularmente membros do filo Firmicutes se tornaram mais abundantes à medida que a gravidade da gengivite aumentava.

Até o momento ainda não há relatos dos principais gêneros e espécies bacterianas identificadas nos estágios moderado e grave de cães com doença periodontal, entretanto, Wallis et al. (2015) afirmaram que os gêneros *Moraxella* sp., sp., *Bergeyella*, *Actinobacteria* e *Neisseria* diminuíram à medida que os cães apresentavam estágios mais avançados da peridontite (WALLIS et al., 2021).

## **2.3 Ações das bactérias na cavidade oral**

### **2.3.1 *Fusobacterium nucleatum***

*Fusobacterium nucleatum* é uma das espécies mais abundantes na cavidade oral, encontrada na cavidade oral de indivíduos saudáveis (FIELD et al., 2012; LOOZEN et al., 2014) e em todos os estágios da doença periodontal, incluindo na gengivite e nas formas irreversíveis da periodontite (KISTLER et al., 2013) sendo que essa prevalência aumenta com a progressão de inflamação e gravidade da doença (RIEP et al., 2009; YANG et al., 2014).

De acordo Jacinto et al. (2008), *F. nucleatum* são Gram-negativas, anaeróbias estritas, imóveis, não esporulante e exclusivas da cavidade oral. Esse gênero está fortemente associado à formação de biofilme, por ter capacidade de agregação com outras espécies. Essa característica foi verificada através de análises genômicas e metabólicas de *F. nucleatum* havendo relatos de fatores de adesão (AMANO, 2010), e sobre a

resistência a alguns antibióticos, como a eritromicina e penicilinas, devido à presença de beta-lactamase (VOHA, et al., 2006).

Por ser uma bactéria adesiva, desempenha um papel fundamental na formação da placa dentária, por codificar várias adesinas para interações entre espécies, sendo as principais a FadA, responsável pela aderência a Gram-negativos e a RadD, com aderência predominante a Gram-positivos, sendo a FadA a adesina que possui o fator de virulência mais caracterizado (KAPLAN, et al., 2014). Tanto essa adesão, quanto a invasão são mecanismos essenciais para a colonização, disseminação e indução de respostas do hospedeiro (STRAUSS et al., 2011; HAN, 2015).

*F. nucleatum* permite a invasão direta nas células hospedeiras, além de aumentar a permeabilidade endotelial, permitindo outras bactérias como *Streptococcus cristatus* e *E. coli* penetrarem (FARDINI et al., 2011). Essa bactéria estimula a liberação de citocinas inflamatórias, IL-6, IL-8 e TNF $\alpha$ , induzindo assim inflamação exacerbada, transformando-se em um patógeno (PARK et al., 2014).

### **2.3.2 *Porphyromonas gingivalis***

*Porphyromonas* têm propriedades que irão facilitar sua capacidade em responder e se adaptar em situações de estresse oxidativo de acordo a condição inflamatória da bolsa periodontal, pois a resposta do patógeno ao estresse é importante para sua virulência. A compreensão de sua estratégia de resistência ao estresse oxidativo é fundamental (HENRY et al., 2012). A formação de biofilme e atividade bacteriana de dipeptidil peptidase IV (DPPIV) contribui para seu potencial patogênico, sendo importante para colonização e crescimento bacteriano (CLAIS et al., 2014).

As bactérias desse gênero possuem componentes que são potencialmente importantes no desenvolvimento de doenças periodontais (YOSHIMURA et al., 2009). As fímbrias, por exemplo, são um fator crítico para a interação desta bactéria com os tecidos hospedeiros, pois elas são susceptíveis de interromper a sinalização celular via matriz extracelular através de proteínas em regiões periodontais, além de serem consideradas extremamente importante para a invasão nas células hospedeiras (AMANO, 2003).

*Porphyromonas gingivalis* se aderem rapidamente à superfície da célula, ativando a autofagia celular, usada por este patógeno para sobreviver, replicar dentro da célula hospedeira e inibir a apoptose. Assim, sua sobrevivência depende da ativação da

autofagia e vitalidade da célula hospedeira endotelial, mas o mecanismo pelo qual isso ocorre, ainda é desconhecido (BELANGER et al., 2006).

Possuem receptores na membrana externa específica, além de proteases (particularmente gingipains) e lipoproteínas para adquirir ferro na forma heme, demonstrando desempenhar um papel essencial em seu crescimento e virulência. Está fortemente correlacionado com periodontite crônica e agressiva, induzindo altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6 por periferia geral CD4 + Células T auxiliares (GONZALES et al., 2014).

### **2.3.3 *Bergeyella zoohelcum* e *Capnocytophaga* spp.**

*Bergeyella zoohelcum* é um bastonete Gram-negativo aeróbio e imóvel, com raros relatos de ser um patógeno zoonótico. É considerada como parte da flora normal de cães, gatos e outros mamíferos (BELTRAN et al., 2006; MURAMATSU et al., 2019). Foi relatado em 1976 por Saphir; Carter a presença dessa bactéria em 38% das raspagens gengivais e 90% na cavidade oral de cães por Bailie et al. (1978). Seu mecanismo de ação na cavidade oral é desconhecido, embora esse microrganismo tenha potencial zoonótico podendo causar sérias infecções em humanos após mordedura animal (SHUKLA et al., 2004).

A bactéria Gram-negativa *Capnocytophaga canimorsus* e *Capnocytophaga cynodegmi* constituem parte significativa da flora oral de cães e gatos (SUZUKI et al., 2010; ANTEZACK et al., 2021). *Capnocytophaga* spp. foi descrita pela primeira vez por Bobo; Newton em 1976, sendo denominada como microrganismo fermentador disgônico 2 (DF-2).

*Capnocytophaga* spp. são bastonetes filamentosos, facultativamente anaeróbicos, gram-negativos com extremidades afiladas e mobilidade deslizante que requerem CO<sub>2</sub> para o crescimento, sendo a *C. cynodegmi* e *C. canimorsus* são diferenciados de outros membros, por serem catalase e oxidase positivas (ZANGENAH; BERGMAN, 2015).

Diferente de *C. canimorsus*, *C. cynodegmi* não é tão bem descrita, mas é encontrada principalmente em infecções de feridas e raramente causa invasão em infecções. *C. canimorsus*, por sua vez, pode causar infecções graves, incluindo sepse, meningite ou endocardite, após contato com cães ou gatos (OEHLER et al., 2009). Além disso, o gênero *Capnocytophaga* é uma das principais fontes de  $\beta$ -lactamases, enzimas

bacterianas que neutralizam os antimicrobianos na cavidade oral e constitui o principal reservatório oral de genes macrolídeo-lincosamida-estreptogramina, que confere resistência, levando a desenvolver a patogenicidade (ANTEZACK et al., 2021).

#### **2.3.4 *Treponema denticola***

Conhecidas por formarem o complexo vermelho, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tanarella forsythia*, são considerados colonizadores de placa subgingival e os patógenos periodontais mais virulentos (MOHANTY et al., 2019; NAGAO; TANIGAWA, 2019). *T. denticola* é uma espiroqueta anaeróbio Gram-negativo que possui quatro flagelos periplasmáticos, facilitando sua motilidade (ABIKO, et al., 2014; DAHLEN; PREUS, 2017).

*T. denticola* é uma das bactérias mais resistentes, cuja presença é identificada frequentemente nas bolsas periodontais e inicia a desregulação da inflamação e da homeostase dos tecidos. No entanto, seus papéis patogênicos ainda precisam ser mais bem estabelecidos (KAUSHIK et al., 2015; MOHANTY et al., 2019).

O potencial patogénico das espiroquetas se dá devido ao fato de liberarem endotoxinas que produzem destruição tecidual pelos efeitos tóxicos diretos ou indiretos, pela ativação e modificação da resposta tecidual do hospedeiro (INAGAKI et al., 2016). Através de um efeito tóxico direto, as endotoxinas podem provocar danos às células e aos vasos, levando à necrose tecidual, pois *T. denticola* é capaz de invadir células profundas por meio da degradação de proteínas de junção epitelial, ZO-1 (proteína Zonula occludens) e claudina-1. Essa capacidade de invasão, é importante para o desenvolvimento e progressão da doença periodontal comprovando a disseminação sistêmica desta bactéria (CHU et al., 2020).

Já o efeito indireto das endotoxinas pode contribuir para o dano tecidual estimulando a ocorrência de reações imunológicas e inflamatórias; liberação de quimiotoxinas; ativação de macrófagos, com o objetivo de influenciar reações imunológicas do hospedeiro. Verificou-se que os patógenos são capazes de ativar caspases inflamatórias que podem induzir morte celular por piroptose, sendo *T. denticola* responsável pelo aumento da lise celular e indução da apoptose e liberação da proteína HSP60 e fibronectina (JUN et al., 2017).

### 2.3.5 *Desulfomicrobium orale*

As bactérias redutoras de sulfato (SRB) são um grupo heterogêneo de microrganismos de ocorrência natural que tem capacidade de converter o sulfato em sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) (KUSHKEVYCH et al., 2019) e compartilham a capacidade de usar sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) ou outros compostos de enxofre na oxidação de compostos orgânicos (CERN et al., 2018).

SRB surge na cavidade oral de aproximadamente 10% de indivíduos saudáveis, porém em pacientes com periodontite, sua ocorrência chega a 86% e está associada ao aumento da profundidade das bolsas periodontais e sangramento (LANGENDIJK et al., 2001). Apesar da SRB estar presente na microbiota oral normal, eles se adaptam melhor às bolsas periodontais, que são ideais para o crescimento dessas bactérias (LANGENDIJK-GENEVAUX et al., 2001).

As bactérias do gênero *Desulfomicrobium* são bastonetes gram-negativas não esporuladas, geralmente móveis com um ou dois flagelos, obrigatoriamente anaeróbico, sendo a espécie *Desulfomicrobium orale* isolada das bolsas periodontais (LANGENDIJK et al., 2001). Esse gênero é metabolicamente idêntico ao gênero *Desulfovibrio*, sendo diferente apenas por bissulfato-redutase com desulforubidina em vez de deulfovirdina (THEVENIEAU, 2007).

A atividade proteolítica que esses microrganismos desempenham na boca é um fator importante no desenvolvimento do mau hálito (DE BOEVER; LOESCHE., 1995), pois compostos de enxofre voláteis (VSCs) são gases responsáveis pela halitose, levando ao desenvolvimento de odores na cavidade oral (KUSHKEVYCH et al., 2019). Esses compostos voláteis são derivados do metabolismo de proteínas bacterianas, que resultam na liberação de compostos tóxicos como escatol, metanotiol e sulfeto de dimetila (BOOPATHY et al., 2002).

O sulfeto detectado em bolsas periodontais mais profundas em altas concentrações inativa a citocromo oxidase celular e se torna altamente tóxico, pois impede as moléculas de oxigênio de se ligarem, resultando na impossibilidade de síntese de ATP e, portanto, na produção de energia (LANGENDIJK et al., 2001). Esses fatores afetam a capacidade dos granulócitos de opsonizar microrganismos, levando à supressão da resposta imune na bolsa periodontal (KUSHKEVYCH, 2015).

Assim, o aumento de SRB nas bolsas depende de certas atividades microbianas que degradam o tecido, pelo fato das bactérias produzirem o fator de virulência que

potencializa o processo de destruição do tecido, de modo que a presença de SRB pode servir como indicador de degradação do tecido na bolsa periodontal (KUSHKEVYCH et al., 2018).

### **2.3.6 *Clostridium difficile***

Pertencente ao filo Firmicutes, *Clostridium difficile* é um bacilo Gram-positivo, anaeróbico, produtor de toxinas, com capacidade para formar esporos que são transmitidos pela via fecal-oral, sendo amplamente presente no ambiente (OREN; GARRITY, 2017; LAWSON et al., 2016).

A infecção por *C. difficile* ocorre principalmente como resultado da transmissão dos esporos, que são resistentes ao calor, ácido e antibióticos (KOCHAN et al., 2017). Dessa forma, com o desequilíbrio dos outros microrganismos, *C. difficile* começa a colonizar e dominar os tecidos e órgãos (LEFFLER; LAMONT, 2015). Sua virulência se dá através de enzimas, como colagenase, hialuronidase, condroitina-sulfatase, bem como toxinas que danificam o citoesqueleto da célula epitelial, levando à ruptura tecidual, secreção de fluido e adesão de neutrófilos, causando intensa inflamação local. Dessa forma, a integridade da barreira tecidual fica comprometida e ocorre perda de função (BAKTASH et al., 2018).

*C. difficile* produz duas toxinas importantes para a patogênese de doenças, A e B, que são enterotóxicos e citotóxicos, sendo a toxina A denominada Benterotoxina A e a toxina B, citotoxina B. Uma terceira toxina *C. difficile* transferase (CDT; ou toxina binária) produzida por algumas cepas de *C. difficile*, pode formar protruções baseadas em microtúbulos nas células epiteliais (SMITS et al., 2016).

As toxinas são transportadas para o citoplasma da célula, onde inativam as proteínas Rho de GTPases, que são responsáveis pela polimerização de actina que estabiliza o citoesqueleto da célula, intensificando ainda mais o processo inflamatório (ANDROGA et al., 2015).

### **2.3.7 *Bacteroides* sp.**

*Bacteroides* são bacilos Gram-negativos, obrigatoriamente anaeróbios, imóveis, não formadores de pigmentos e esporos, produzem ácido succínico e ácidos acéticos

(KIERZKOWSKA et al., 2017). Esses microrganismos são componentes naturais da microbiota da cavidade oral de cães e gatos (GOLDSTEIN, et al., 2018).

*B. pyogenes* foi isolado pela primeira vez de abscessos e fezes de porcos na década de 1980, útero da metrite (BENNO et al., 1983; JEON et al., 2016; CUNHA et al., 2019) e de ferida de cavalos (OVESEN et al., 2016) e é um dos responsáveis por causar infecções orais crônicas que se espalham para os tecidos circundantes podendo causar necrose, osteomielite e fístula, embora esses mecanismos não sejam esclarecidos (MAJEWSKA et al., 2021). Osteíte e osteomielite são complicações graves, porém são casos incomuns, causados por bactérias oriundas do tecido mole, do seio da face, ou infecção dentária, sendo a *B. pyogenes* participante destas patologias (BROOK, 2016).

*Bacteroides* spp. são caracterizados por serem altamente resistentes a antibióticos (NAGY et al., 2018) entretanto, *B. pyogenes* isolados de humanos ou animais já demonstrou ser suscetível à penicilina devido à falta de produção de beta lactamase, característica que o distingue de outras espécies do gênero *Bacteroides* (JEON et al., 2016; BERENGER et al., 2015).

### **2.3.8 *Pasteurella multocida***

*Pasteurella multocida* é um cocobacilo Gram-negativo fermentativo anaeróbio facultativo encontrado na orofaringe de animais saudáveis, particularmente gatos, cães e porcos, além de vários animais selvagens (WILKIE et al., 2012). Embora não sejam comuns, as infecções em humanos causadas por *P. multocida* geralmente estão associadas à mordidas ou arranhões de animais (WILSON; HO, 2013).

De acordo com Wilkie et al. (2012) as manifestações clínicas de infecção por *P. multocida* dependerão das características genéticas de cepas, pois estas exibem a predileção por hospedeiro. As manifestações clínicas podem ser assintomáticas ou crônicas, em que os indivíduos apresentam inflamação respiratória, pneumonia, ou outras infecções disseminadas (WILSON; HO, 2013).

Alguns fatores de virulência contribuem para a patogênese de *P. multocida*, os quais incluem os genes envolvidos na formação da cápsula, lipopolissacarídeo (LPS), fímbrias e adesinas, toxinas, ferro proteínas reguladas e de aquisição de ferro, metabolismo do ácido siálico, hialuronidase e proteínas da membrana externa (OMPs) (HARPER et al., 2006).

Os dois principais componentes da superfície bacteriana são a cápsula e LPS, que classificam a *P. multocida* em um dos cinco grupos capsulares (A, B, D, E, F) ou em 16 sorotipos somáticos de acordo com sua cápsula e antígenos LPS, respectivamente (TOWNSEND et al., 2001; HARPER et al., 2015).

A cápsula desempenha um papel significativo na resistência à fagocitose, já o lipopolissacarídeo de *Pasteurella multocida* desempenha um papel crítico na patogênese da doença, devido ao estímulo imune-humoral que confere proteção. As fímbrias desempenham um papel na adesão da superfície celular (PENG et al., 2018). No entanto, o papel da *P. multocida* na cavidade oral ainda não é esclarecido.

### **2.3.9 *Aminobacterium colombiense***

Pertencente ao filo Synergistetes, *Aminobacterium colombiense* tem esse nome devido a sua capacidade de fermentar aminoácidos. A cepa ALA-1T foi isolada de uma lagoa anaeróbia de águas de laticínios em 1998, sendo o único isolado conhecido desta espécie (BAENA et al., 2000). Esse microrganismo não cultivável é frequentemente obtido de habitats anaeróbicos, sugerindo uma contribuição da *Aminobacterium* para as comunidades procarióticas anaeróbicas (CHERTKOV et al., 2010).

As espécies de *Aminobacterium* são bastonetes curvos, Gram-negativas e não esporulados, que promovem a degradação de aminoácidos assacarolíticos que podem desempenhar papel importante na renovação de aminoácidos em ecossistemas de resíduos lácteos ricos em proteínas, geralmente na presença de parceiros hidrogenotróficos, tendo como resultado a fermentação e liberação de acetato e H<sub>2</sub> (BAENA et al., 2000).



### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a diversidade bacteriana da placa subgingival de cães com gengiva saudável e com doença periodontal leve, moderada e grave, antes do tratamento, e após tratamento de 30 e 60 dias com gel odontológico veterinário a base de *Aloe vera* e chá verde, utilizando o sequenciamento de amplicons de rRNA 16S em larga escala, pela plataforma Illumina MiSeq.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- I) Avaliar a população bacteriana dos animais participantes do estudo do grupo controle e com doença periodontal leve, moderada e grave antes da aplicação do gel odontológico veterinário;
- II) Avaliar a população bacteriana dos animais participantes do estudo do grupo controle e com doença periodontal leve, moderada e grave aos 30 dias de aplicação do gel odontológico veterinário;
- III) Avaliar a população bacteriana dos animais participantes do estudo do grupo controle e com doença periodontal leve, moderada e grave aos 60 dias de aplicação do gel odontológico veterinário;
- IV) Caracterizar qualitativamente a população bacteriana oral de acordo com os grupos avaliados;
- V) Comparar a comunidade microbiota periodontal em estágios diferentes de tratamento resistentes ao gel odontológico.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1 Considerações éticas**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Cruz sob o número 009/2019. Os tutores assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido autorizando os cães a participarem da pesquisa.

O estudo também foi realizado considerando os princípios de “Boas Práticas Clínicas” VICH GL9 (GCP) adotados pelo Comitê de Medicamentos para Uso Veterinário (CVMP), 2016: 1-22, Agência Europeia de Medicamentos (EMA), em junho de 2000.

### **4.2 Local de realização do projeto**

O projeto foi realizado na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Foram coletadas amostras de placas subgingivais nos dentes superiores dos cães nos ambulatórios do Hospital Veterinário. As extrações de DNA e preparação e purificação das bibliotecas bacterianas foram realizadas no Centro de Biotecnologia e Genética (CBG) da UESC. O sequenciamento foi realizado no laboratório Genomics Center, na Universidade de Minnesota (Estados Unidos).

### **4.3 Animais participantes do projeto**

Participaram do projeto 40 cães, com peso até 15 kg, independente de sexo ou raça, com idades entre 1 e 10 anos, provenientes da rotina clínica de atendimento do Hospital Veterinário da UESC, Ilhéus, BA. Para critério de inclusão, somente animais alimentados com dieta comercial seca (ração) foram selecionados e nenhum deles fez uso de antibióticos, tratamento odontológico veterinário ou escovação doméstica nos últimos três meses antes do início do projeto.

#### 4.4 Classificação da doença periodontal e delineamento experimental

O diagnóstico da doença periodontal foi realizado através da avaliação clínica e por aferição da profundidade dos sulcos subgengivais e no nível clínico de inserção (medida da exposição da raiz dentária) com sonda periodontal milimetrada (Figura 6).



**Figura 6:** Sondagem do dente canino com sonda periodontal milimetrada para classificação do estágio da DP. Fonte: Arquivo pessoal.

Após a avaliação clínica, os animais foram divididos em quatro grupos distintos de acordo com a classificação da American Veterinary Dental College (AVDC, 2016) para doença periodontal. Dessa forma, 10 cães fizeram parte do grupo controle (G1), pois apresentaram a cavidade oral saudável; 10 cães fizeram parte do grupo com doença periodontal leve (G2), apresentando gengivite e sulco periodontal  $< 3\text{mm}$ , sem retração gengival; 10 cães apresentaram doença periodontal moderada (G3) com deposição de cálculos, intensa gengivite, sulco subgengival  $> 3\text{mm}$  e leve retração gengival; e, por fim, foram selecionados 10 cães com doença periodontal grave (G4), em que os animais apresentaram grande deposição de placa bacteriana e cálculos dentários, sulco subgengival  $> 3\text{mm}$ , retração gengival  $> 5\text{mm}$  e exposição de raiz dentária.

#### 4.5 Coleta de material para análises

A placa subgengival dos animais foi coletada com curetas estéreis dos dentes superiores caninos, pré-molares e molares, antes do início do tratamento, 30 dias e 60 dias após o tratamento com o gel odontológico veterinário. As placas subgengivais coletadas foram acondicionadas em 350 µl de tampão TE (50 mM Tris pH 7,6, EDTA 1 mM, pH 8,0 e 0,5% de Tween 20) e ficaram armazenadas a - 80°C, até o processamento das amostras.

#### **4.6 Tratamento com Tropiclean Fresh Breath Clean Teeth Gel®**

O produto foi aplicado de acordo com a recomendação do fabricante (Tropiclean, 2010), com o uso de luvas, diretamente sobre os dentes dos animais de todos os grupos, diariamente, durante 60 dias, na casa dos próprios animais e por membros da equipe do estudo. Os animais não recebiam água e alimento por 30 minutos antes e após a aplicação.

#### **4.7 Preparação dos pools e divisão dos grupos**

As amostras coletadas dos dentes de todos os animais foram liofilizadas e realizou-se 12 pools, juntando todas as amostras de cada grupo experimental de acordo o estágio da doença periodontal de cada grupo experimental. Os grupos foram nomeados conforme a tabela 01.

**Tabela 01.** Divisão dos grupos experimentais para realização do pool

<b>Grupos experimentais</b>	<b>Antes do uso do Gel</b>	<b>30 dias após uso do Gel</b>	<b>60 dias após uso do Gel</b>
Grupo Controle	CSG	C1G	C2G
Grupo Leve	LSG	L1G	L2G
Grupo Moderado	MSG	M1G	M2G
Grupo Grave	GSG	G1G	G2G

#### **4.8 Extração de DNA**

Para extrair o DNA, as amostras de cada grupo foram colocadas em um tubo contendo esferas e um tampão que ao serem agitadas, promoviam a liberação dos fragmentos do DNA. Utilizando o Kit Dneasy powersoil (protocolo no anexo 1), realizou-se a extração do DNA de cada pool de acordo com as recomendações do fabricante nas amostras do dia um (antes do início do tratamento), dos dias 30 e dia 60 de cada grupo.

## 4.9 Preparação das bibliotecas de DNA

### 4.9.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para amplificação da região hipervariável V3-V4 do gene ribossomal 16S rRNA para bactérias foi realizada PCR em reação com volume final de 25  $\mu$ L, contendo 2  $\mu$ L de DNA, 12,5  $\mu$ L de HiFi HotStart Ready Mix PCR Kit (Kapa Biosystems), 10  $\mu$ L (5  $\mu$ L do *F* e 5  $\mu$ L do *R*) dos oligonucleotídeos universais (Tabela 02) em concentração final de 10 pM.

**Tabela 02.** Oligonucleotídeos universais utilizados na reação de PCR

Primer	Sequência 5' – 3'	Tamanho Amplicon
16SMetag F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACA GCCTACGGGNGGCWGCAG	550 pb
16SMetag R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGAC AGGACTACHVGGGTATCTAATCC	

A reação foi realizada em duplicata nas seguintes condições: desnaturação inicial do DNA molde por 3 min a 95 °C, seguida de 25 ciclos compostos de 30 s a 95 °C de desnaturação, 55 °C para anelamento dos oligonucleotídeos, 72 °C de extensão do primer e 5 min a 72 °C de extensão final. Após a reação de PCR, foi feita uma corrida de eletroforese em gel de agarose 1,0% (Anexo 2) para avaliar o funcionamento da amplificação.

### 4.9.2 Purificação

Todo o volume das amostras biológicas obtidas a partir da PCR foi purificado utilizando o Kit AMPure® XP, composto por esferas e uma placa magnética (Figura 7). As lavagens foram realizadas em duas etapas com Etanol 80% preparado na hora. Após a secagem das esferas com os fragmentos amplificados pela PCR, adicionou-se 52,5 µL de Tris 10 mM (pH 8,5), incubado à temperatura ambiente durante 2 minutos e em seguida transferiu-se o sobrenadante cuidadosamente para uma nova placa.



**Figura 7:** Placa de 96 poços acoplada a uma placa magnética durante a purificação das bibliotecas. Fonte: Arquivo pessoal.

#### 4.9.3 Index

Índices foram adicionados nas amostras para diferenciar cada biblioteca durante o sequenciamento utilizando o kit “NexTera XT Index”. Realizou-se uma nova PCR com volume final de 50 µL, contendo 5 µL da primeira purificação (biblioteca), 25 µL de HiFi HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems), 5 µL do “Nextera XT Index 1 Primers (N7XX)”, 5 µL do “Nextera XT Index 2 Primers (S5XX)” e 10 µL de água ultra pura. Os índices (Index 1 Primers e Index 2 Primers) (Tabela 03) foram selecionados previamente pelo software MiSeq Control v2.6.

Seguindo recomendações do protocolo da Illumina (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation), a PCR foi realizada com número específico de ciclos para garantir que as bibliotecas produzissem resultados de alta qualidade. A reação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial do DNA molde por 3 min a 95 °C, seguida de 8 ciclos compostos de 30 s a 95 °C de desnaturação, 55 °C para anelamento, 72 °C de extensão do primer e 5 min a 72 °C de extensão final. Após a reação, as

bibliotecas foram purificadas novamente (Kit AMPure® XP) e verificou-se através de uma nova corrida em gel de agarose 1,0% se ocorreu o comprimento esperado das sequências, de aproximadamente 630 pb.

**Tabela 03.** Index selecionados pelo software MiSeq Control v2.6

Amostra	Index (I7)	Index (I5)
<i>Amostras</i>		
CSG	TAAGGCGA	CTCTCTAT
C1G	CGTACTAG	CTCTCTAT
C2G	AGGCAGAA	CTCTCTAT
LSG	TCCTGAGC	CTCTCTAT
L1G	GGACTCCT	CTCTCTAT
L2G	TAGGCATG	CTCTCTAT
MSG	TAAGGCGA	TATCCTCT
M1G	CGTACTAG	TATCCTCT
M2G	AGGCAGAA	TATCCTCT
GSG	TCCTGAGC	TATCCTCT
G1G	GGACTCCT	TATCCTCT
G2G	TAGGCATG	TATCCTCT

#### 4.9.4 Quantificação das bibliotecas - RT-qPCR

As bibliotecas de DNA foram quantificadas por um ensaio de qPCR utilizando o kit “Kapa Library Quantification” para plataformas de sequenciamento Illumina. As amostras foram diluídas para 1:1.000.000 em solução Tris-HCl + 0,05% Tween 20 e preparadas para quantificação com volume final de 20 µL, contendo 12 µL de MasterMix, 4 µL da biblioteca diluída e 4 µL de água ultra pura. Seis padrões de concentrações variadas (20 pM, 2pM, 0,2pM, 0,02pM, 0,002pM e 0,0002pM) também foram adicionados para compor a curva de referência da quantificação. Na placa de 96 poços todas as amostras foram aplicadas em triplicatas, seguindo-se a seguinte ordem: 18 padrões, 36 bibliotecas diluídas e 3 brancos.

Construiu-se uma curva a partir dos valores encontrados da quantificação. As concentrações das amostras foram calculadas através de fórmulas gerando uma biblioteca mãe em nM, na qual foi realizado um novo “pool” de 4nM e novamente quantificado seguindo o mesmo procedimento citado acima.

#### 4.9.5 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado no laboratório Genomics Center na Universidade de Minnesota (EUA). As bibliotecas foram enviadas em uma concentração final de 2nM, sendo um “*pool*” de cada grupo experimental de tratamento, contendo 15µL de cada amostra e um mL de etanol a 100%. O sequenciamento foi realizado segundo a metodologia utilizada pelo próprio laboratório de Minnesota.

#### 4.10 Bioinformática

Para analisar os resultados do sequenciamento foram utilizados softwares específicos. Para realizar as leituras obtidas a partir do sequenciamento contendo a sequência da molécula de interesse, além da sequência do adaptador, removeu-se os primers dos adaptadores ficando apenas a parte relevante da leitura de interesse para ser analisada, utilizando o cutadapt, (programa de linha de comando que suporta vários formatos de arquivo produzidos por sequenciadores de segunda geração) (MARTIN, 2011).

Para pesquisa de banco de dados de sequência foi utilizado o programa USEARCH com o objetivo de atribuir sequências a clusters para a leitura de todas as sequências homólogas, através da realização de filtragem de qualidade, união dos pares, que possibilita a identificação de sequências únicas e abundância e clusterização de OTUs com 97% de similaridade (EDGAR, 2010).

MAPseq foi utilizado por fornecer uma sequência rápida e precisa do mapeamento das sequências dos genes de rRNA detectados. Foram classificadas as OTUs encontradas no banco de dados NCBI Taxonomy e OTU taxonomies, contra OTUs agrupados em 97% de identidade, bem como contra categorias taxonômicas em nível de gênero e espécie (RODRIGUES et al., 2017).

Como ferramenta de visualização para análises dos dados gerados no sequenciamento, utilizou-se o Krona, um gráfico de visualização interativa possibilitando representações mais claras de estimativas de abundância e permitindo uma compreensão aprofundada, pois o design do Krona com cada gráfico contido em um único arquivo, possibilitou explorar cada grupo bacteriano de suas respectivas unidades taxonômica a partir da metagenômica (ONDOV et al., 2011).



## **4.11 Análise estatística**

### **4.11.1 Comparação entre os gêneros de cada grupo**

Dentro de cada gênero foi calculado a proporção das respectivas espécies em cada grupo. A comparação entre as porcentagens de cada espécie (do mesmo gênero) nos grupos e nos tempos avaliados (STxG1 e STxG2, onde: ST = sem tratamento, G1 = 1 mês de tratamento; e G2 = 2 meses de tratamento) foi realizada pelo teste Exato de Fisher ou qui quadrado, considerando apenas as espécies encontradas nos pares de grupos. Os mesmos testes foram utilizados para comparar as porcentagens das espécies de bactérias (do mesmo gênero) nos quatro grupos sem a influência de tratamento (tempo zero). Para ambas as análises foi considerada significância quando o valor de p foi menor que 0.05, com correção de Bonferroni.

### **4.11.2 Comparação do efeito do tratamento**

Foi comparada a diferença entre as proporções das espécies de bactérias nos três períodos avaliados (ST, G1 e G2), independente do estágio de infecção (Controle, Leve, Moderado ou Grave), na intenção de identificar se houve diminuição ou aumento com o uso do tratamento. Para tal análise foi realizado o teste de normalidade da proporção na espécie e então os testes paramétricos ANOVA ou não paramétricos Mann-Whitney, com post hoc e correção de *Bonferroni* (considerando significativo quando  $p < 0.05$ ).

## 5. Resultados

### 5.1 Cães participantes do estudo

Dos animais selecionados para o estudo 22 eram fêmeas e 18 machos, com pesos entre 4 e 14 kg. As raças foram variadas, sendo Poodle (n=6), Sharpei (n=2), Cocker Spaniel (n=1), Labrador retriever (n=2), Yorkshire (n=1), Shih tzu (n=4), Pinscher (n=8) e Sem raça definida (n=16). Observou-se que os 20 cães selecionados para o grupo controle e leve tinham entre um e quatro anos de idade. Já os 20 animais selecionados para os grupos moderado e grave da doença periodontal (DP), tinham entre cinco anos e 10 anos de idade.

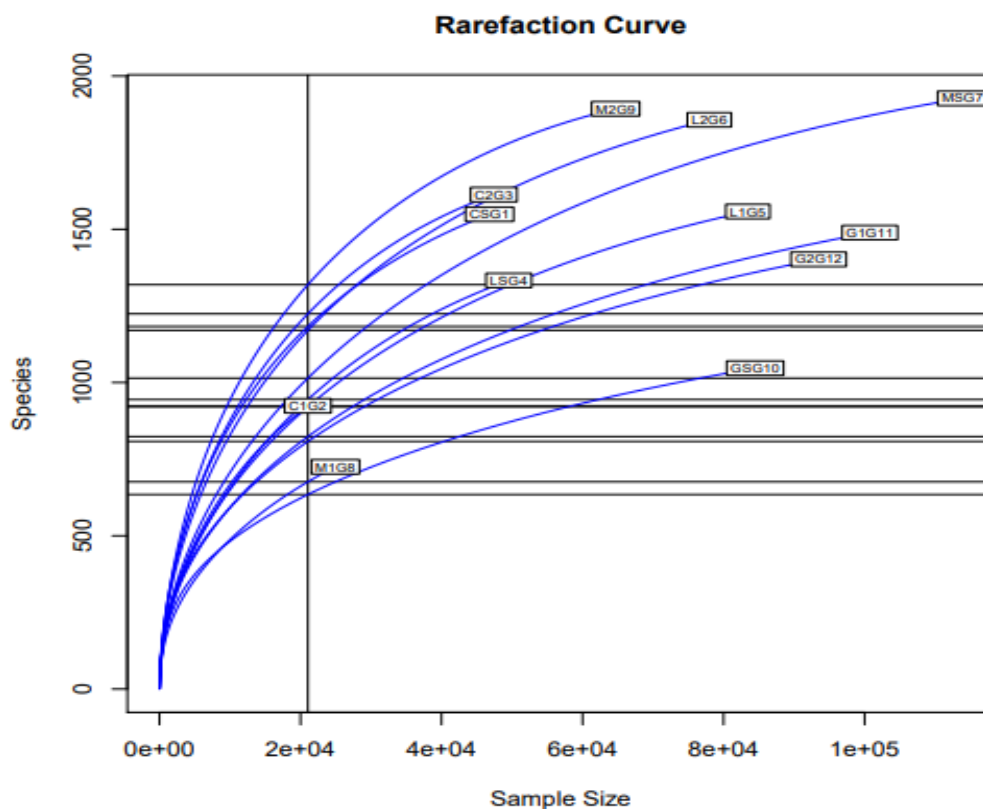
### 5.2 Qualidade do Sequenciamento

O sequenciamento realizado pela plataforma Illumina MiSeq produziu um total de 1.360,433 sequências de amplicon 16S rRNA, com uma média de 113,369 sequências por amostra após filtragem de qualidade. Para todos os grupos experimentais foram realizadas leituras, demonstrando o número de pares de leitura por amostra no início da análise por sequenciamento (Tabela 04).

**Tabela 04.** Total de reads e porcentagem por amostra no sequenciamento

Amostras	Reads	Porcentagem de reads
Controle Sem Gel (CSG)	78,285	24.36%
Controle 30 dias pós Gel (C1G)	34,426	26.09%
Controle 60 dias pós Gel (C2G)	88,175	22.16%
Leve Sem Gel (LSG)	85,792	22.68%
Leve 30 dias pós Gel (L1G)	133,183	21.38%
Leve 60 dias pós Gel (L2G)	134,657	22.52%
Moderado Sem Gel (MSG)	198,477	19.22%
Moderado 30 dias pós Gel (M1G)	39,935	24.53%
Moderado 60 dias pós Gel (M2G)	128,326	20.25%
Grave Sem Gel (GSG)	133,577	19.88%
Grave 30 dias pós Gel (G1G)	155,019	19.24%
Grave 60 dias pós Gel (G2G)	150,581	20.61%

Foram identificadas 844 OTUs com 97% de identidade e para a análise da diversidade bacteriana, gerou-se curvas de rarefação a partir das sequências por amostra das bibliotecas para os 12 grupos experimentais, indicando que a amostragem foi suficiente para analisar e gerar as OTUs da população bacteriana (Figura 8).



**Figura 8:** Gráfico com curvas de rarefação demonstrando riqueza de espécies distribuídas para 12 amostras dos grupos experimentais controle, leve, moderado e grave, antes do tratamento (CSG, LSG, MSG, GSG), 30 de tratamento (C1G, L1G, M1G, G1G) e 60 dias de tratamento (C2G, L2G, M2G, G2G).

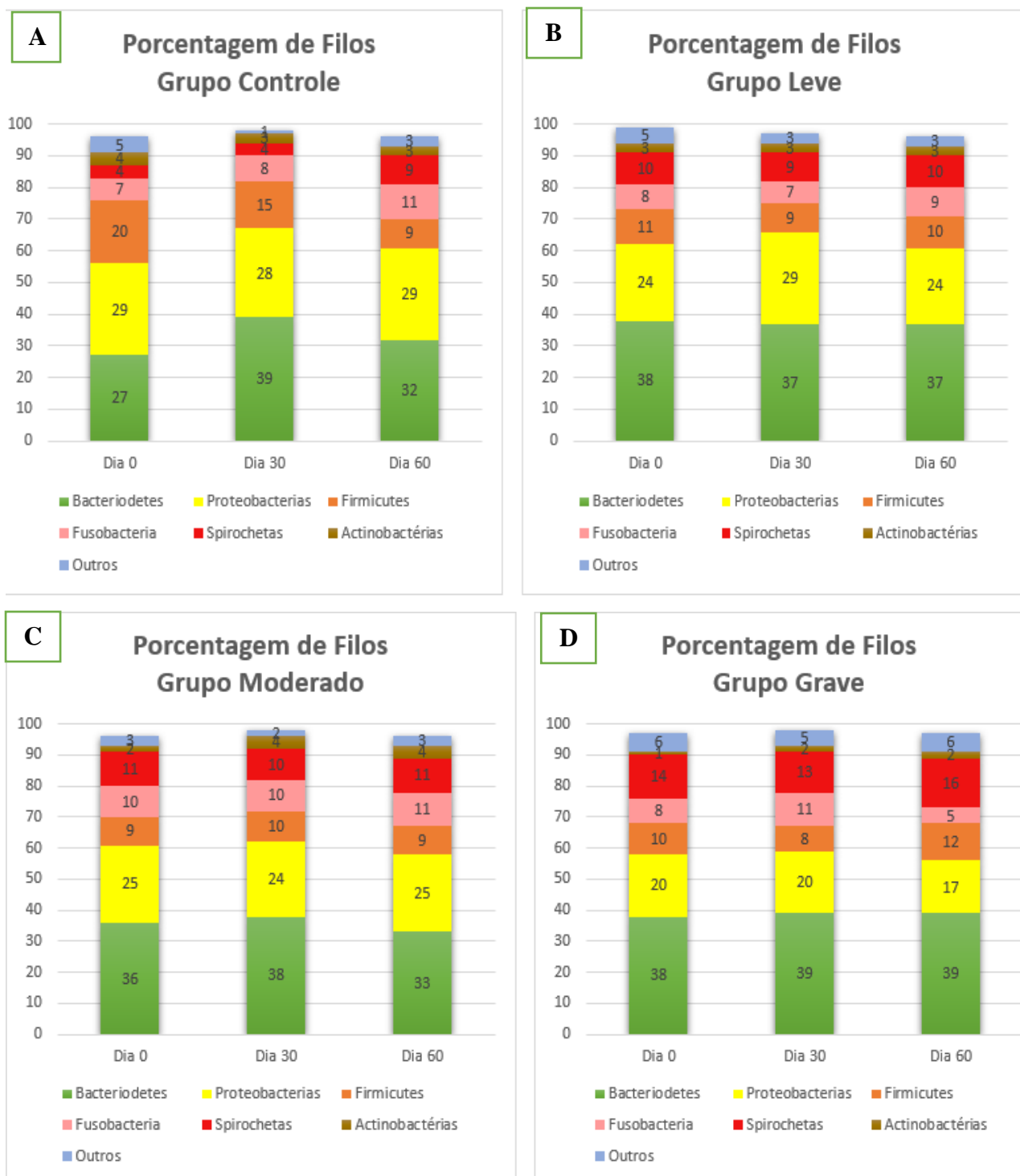
O gráfico de rarefação demonstra que no grupo controle (CSG), há em torno de 1500 espécies, havendo redução para menos de 1000 espécies após 30 dias de tratamento (C1G) e um aumento das espécies após 60 dias (C2G). No grupo leve (LSG) há em torno de 1200 espécies que aumentam após 30 (L1G) e 60 dias (L2G). Os animais com

periodontite moderada antes do tratamento (MSG) apresentaram maior riqueza e diversidade de espécies do que nos demais grupos. No moderado pós 30 dias de tratamento (M1G) ocorre uma redução significativa dessa riqueza populacional (800 espécies), e esse grupo após 60 dias de tratamento volta a aumentar apresentando maior quantidade de espécies. No grupo grave antes do tratamento (GSG) há em torno de 1000 espécies e há aumento dessa riqueza em torno de 1400 espécies após 30 e 60 dias (G1G e G2G).

### **5.3 Análise da população bacteriana**

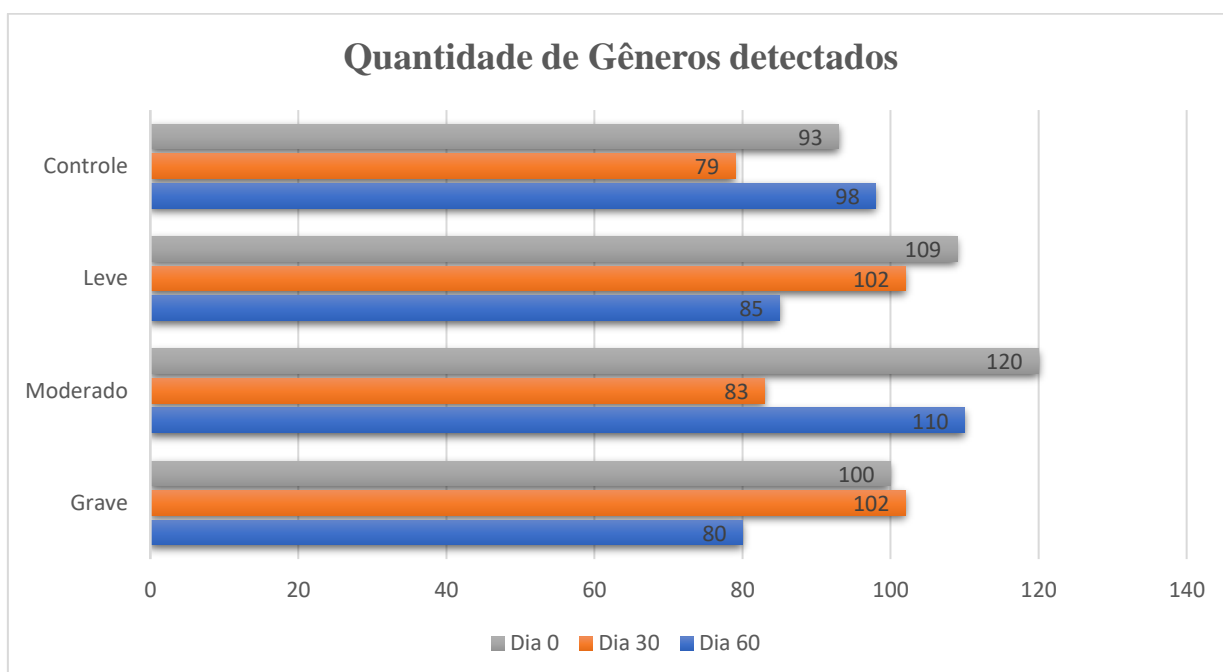
As bactérias identificadas foram classificadas de acordo com filo, classe, ordem, família e gênero de cada grupo experimental. Como não houve variação de OTUs para essas classificações taxonômicas dentro do mesmo grupo de tratamento em tempos diferentes, apenas a quantidade das OTUs presentes em cada grupo (controle, leve, moderado e grave) foram consideradas. Assim foram identificadas em cada grupo: 13 filos, 30 classes, 37 ordens e 45 famílias.

Das OTUs identificadas, 98% são relacionadas a bactérias e 2% à Arqueas e Eucariotos. Um total de 13 filos bacterianos foram detectados, sendo seis os mais prevalentes em todos os grupos experimentais: Bacteriodetes, Proteobactérias, Firmicutes, Fusobactéria, Espiroquetas e Actinobactérias. Em proporções menores foram detectados Synergistetes, Tenericutes Ignavibacteriae, Gemmatimonadetes, Elusimicrobia, Cyanobacteria, Chlorophyta. As porcentagens de cada grupo encontram-se na figura 09.



**Figura 9:** Porcentagem dos filos bacterianos predominantes identificados nos três tempos antes, 30 e 60 dias após tratamento dos grupos A) controle; B) leve; C) moderado e D) grave. Outros representam os filos encontrados em proporções menores (1% e < 1%).

Houve variação de quantidade dentro do mesmo grupo de tratamento para os gêneros (Figura 10). Foram identificados um total de 270 gêneros no grupo controle, 296 gêneros no grupo leve, 299 no grupo moderado e no grupo grave 282 gêneros. Os gêneros que tiveram maior proporção em todos os grupos foram *Porphyromonas* (8 espécies), *Bacteroides* (3 espécies), *Treponema* (3 espécies), *Moraxella* (2 espécies), *Bergeyella*, *Capnocytophaga*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Pasteurella*, *Neisseria*, *Campylobacter*, *Aminobacterium*, *Acholeplasma*, *Desulfomicrobium*, *Barnesiella* e *Cavibacter* cada um com uma espécie.



**Figura 10:** Quantidade de gêneros identificados no grupo controle, leve, moderado e grave antes do tratamento, 30 e 60 dias após o tratamento.

Em relação às espécies bacterianas foram identificadas 812 OTUs no grupo controle, 821 OTUs no grupo leve, 897 OTUs no grupo moderado e 846 OTUs no grupo grave. Entretanto, foram excluídas das análises todas as bactérias com leituras de sequências abaixo de 1000 reads, sendo então consideradas para as análises 28 espécies bacterianas nos animais avaliados, pertencentes a sete filos e 16 gêneros (Tabela 05).

**Tabela 05.** Reads das OTUs dos gêneros mais abundantes identificados na boca de cães com gengiva saudável, DP leve, moderada e grave através do sequenciamento, antes do tratamento com 30 e 60 dias pós tratamento.

<b>Gêneros</b>	<b>Controle</b>	<b>Leve</b>	<b>Moderado</b>	<b>Grave</b>
<i>Porphyromonas (1)</i>	Dia 0 - 5637 Dia 30 - 2731 Dia 60 - 5924	Dia 0 - 8484 Dia 30 - 8101 Dia 60 - 6223	Dia 0 - 6602 Dia 30 - 1745 Dia 60 - 3439	Dia 0 - 6733 Dia 30 - 2091 Dia 60 - 1725
<i>Capnocytophaga (1)</i>	Dia 0 - 1148 Dia 30 - 1074 Dia 60 - 1561	X	Dia 0 - 1198 Dia 30 - 1397 Dia 60 - 1831	X
<i>Bergeyella (1)</i>	Dia 0 - 1741 Dia 30 - 2593 Dia 60 - 1665	X	X	X
<i>Bacteroides (1)</i>	X	Dia 0 - 3202 Dia 30 - 4668 Dia 60 - 4857	Dia 0 - 6533 Dia 30 - 1872 Dia 60 - 4028	Dia 0 - 6417 Dia 30 - 6296 Dia 60 - 6244
<i>Barnesiella (1)</i>	X	X	X	Dia 0 - 2599 Dia 30 - 1847 Dia 60 - 4020
<i>Clostridioides (2)</i>	Dia 0 - 2067 Dia 30 - 2437 Dia 60 - 3663	Dia 0 - 1153 Dia 30 - 1801 Dia 60 - 2457	Dia 0 - 3455 Dia 30 - 2278 Dia 60 - 1935	Dia 0 - 1416 Dia 30 - 2664 Dia 60 - 1719
<i>Fusobacterium (3)</i>	Dia 0 - 2511 Dia 30 - 1359 Dia 60 - 3873	Dia 0 - 3369 Dia 30 - 5106 Dia 60 - 5989	Dia 0 - 8472 Dia 30 - 2080 Dia 60 - 5702	Dia 0 - 4142 Dia 30 - 6137 Dia 60 - 3831
<i>Cavibacter (3)</i>	X	X	X	Dia 0 - 2511 Dia 30 - 1359 Dia 60 - 3873
<i>Moraxella (4)</i>	Dia 0 - 1102 Dia 30 - 1194 Dia 60 - 2789	Dia 0 - 1520 Dia 30 - 5450 Dia 60 - 3038	Dia 0 - 3195 Dia 30 - 1911 Dia 60 - 1399	Dia 0 - 2132 Dia 30 - 3277 Dia 60 - 1297
<i>Desulfomicrobium (4)</i>	X	X	Dia 0 - 1112 Dia 30 - 1095 Dia 60 - 1493	Dia 0 - 2726 Dia 30 - 1787 Dia 60 - 1298
<i>Neisseria (4)</i>	Dia 0 - 1814 Dia 30 - 1410 Dia 60 - 1266	X	X	X
<i>Pasteurella (4)</i>	X	Dia 0 - 1809 Dia 30 - 3057	Dia 0 - 2001 Dia 30 - 1645	Dia 0 - 1112 Dia 30 - 2089

		Dia 60 – 1625	Dia 60 – 1891	Dia 60 – 1225
<i>Campylobacter</i> (4)	X	Dia 0 - 2427	Dia 0 - 5106	Dia 0 - 2950
		Dia 30 – 2871	Dia 30 – 1910	Dia 30 – 3455
		Dia 60 – 3065	Dia 60 – 3411	Dia 60 – 2590
<i>Aminobacterium</i> (5)	X	X	Dia 0 - 1316	Dia 0 - 1461
			Dia 30 – X	Dia 30 - 1637
			Dia 60 – X	Dia 60 – 1610
<i>Treponema</i> (6)	X	Dia 0 - 4620	Dia 0 - 4012	Dia 0 - 5544
		Dia 30 - 7260	Dia 30 – 6781	Dia 30 – 6178
		Dia 60 – 7245	Dia 60 -1425	Dia 60 – 5977
<i>Acholeplasma</i> (7)	X	Dia 0 - 1413	Dia 0 - 1931	Dia 0 - 2258
		Dia 30 – 1023	Dia 30 – 1764	Dia 30 – 2383
		Dia 60 – 1187	Dia 60 - 1888	Dia 60 – 2675

Legenda: \*Gêneros pertencentes aos filos: (1) Bacteroidetes; (2) Firmicutes; (3) Fusobacteria; (4) Proteobacteria; (5) Synergistetes; (6) Espiroquetas; (7) Tenericutes.

\*\* Letra X representa os grupos em que não ocorreram leituras para o gênero.

#### 5.4 Comparação entre os grupos experimentais de tratamento

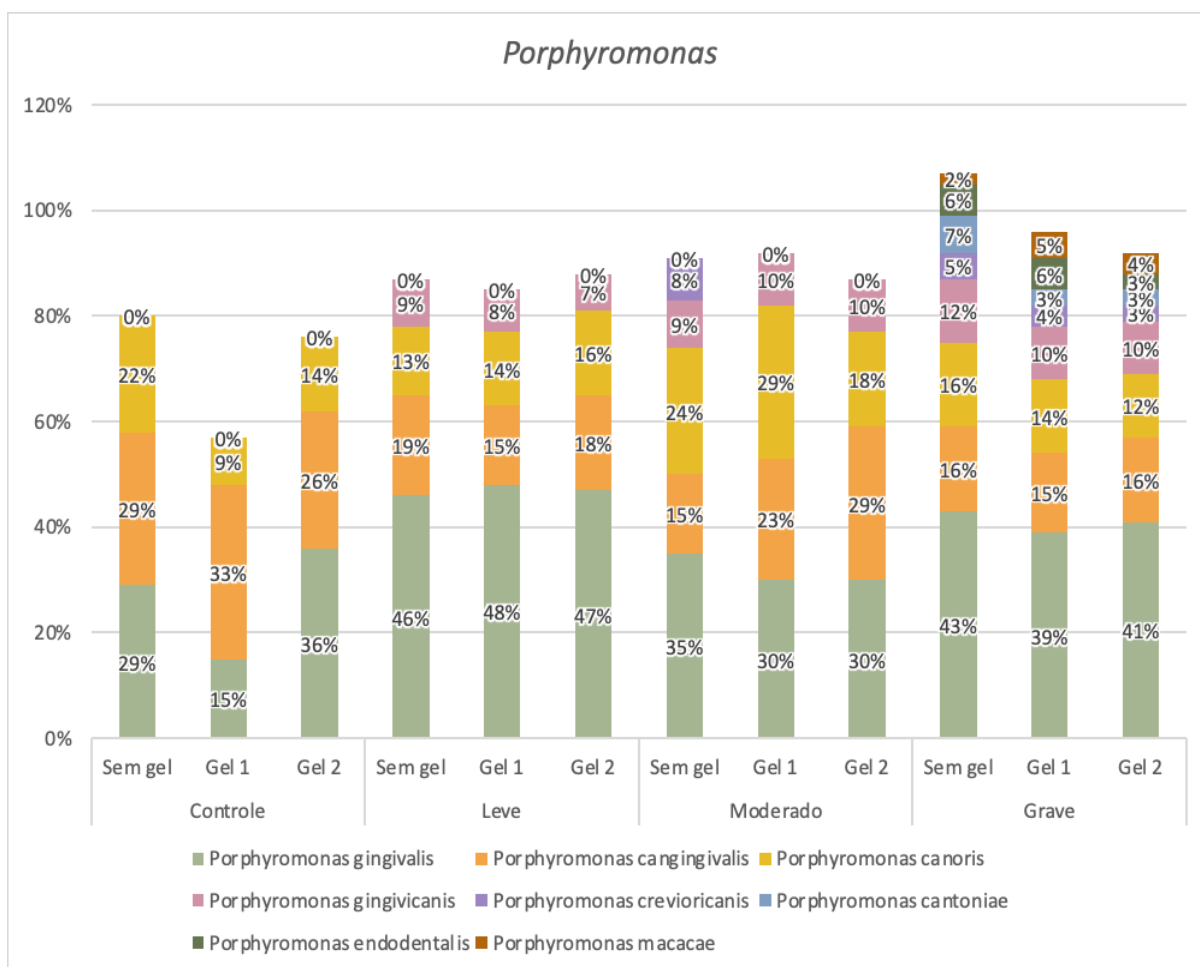
Seis espécies (*P. gingivalis*, *P. cangingivalis*, *P. canoris*, *C. difficili*, *F. nucleatum* e *Campylobacter rectus*) estavam presentes em todos os grupos (controle e com periodontite leve, moderada e grave), uma estava presente apenas no grupo sem infecção (*Neisseria zoodegmatis*) e cinco estavam presentes apenas no grupo com infecção grave (*B. pyogenes*, *P. cantoniae*, *P. endodontalis*, *P. macacae*, *Treponema Vicentii*) (Tabela 06).



**Tabela 06.** Espécies de bactérias com seus respectivos gêneros e filios em cada grupo avaliado.

Filos	Espécies de bactérias	Controle	Leve	Moderado	Grave
Bacteroidetes	<i>Bergeyella zoohelcum</i>	x	x		
	<i>Capnocytophaga cynodegmi</i>	x	x	x	
	<i>Bacteroides gallinarum</i>		x	x	x
	<i>Bacteroides uniformis</i>		x	x	x
	<i>Bacteroides pyogenes</i>				x
	<i>Barnesiella viscericola</i>			x	x
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	x	x	x	x
	<i>Porphyromonas cangingivalis</i>	x	x	x	x
	<i>Porphyromonas canoris</i>	x	x	x	x
	<i>Porphyromonas gingivicanis</i>		x	x	x
	<i>Porphyromonas crevioricanis</i>			x	x
	<i>Porphyromonas cantoniae</i>				x
	<i>Porphyromonas endodontalis</i>				x
<i>Porphyromonas macacae</i>				x	
Firmicutes	<i>Clostridioides difficile</i>	x	x	x	x
Fusobacteria	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	x	x	x	x
	<i>Cavibacter abscessus</i>			x	x
Proteobacteria	<i>Neisseria zoodegmatidis</i>	x			
	<i>Moraxella lacunata</i>	x	x	x	
	<i>Moraxella osloensis</i>		x	x	x
	<i>Pasteurella multocida</i>		x	x	x
	<i>Campylobacter rectus</i>	x	x	x	x
	<i>Desulfomicrobium orale</i>			x	x
Spirochaetes	<i>Treponema denticola</i>		x	x	x
	<i>Treponema maltophilum</i>		x	x	x
	<i>Treponema vicentii</i>				x
Tenericutes	<i>Acholeplasma axanthum</i>		x	x	x
Synergistetes	<i>Aminobacterium colombiense</i>		x	x	x

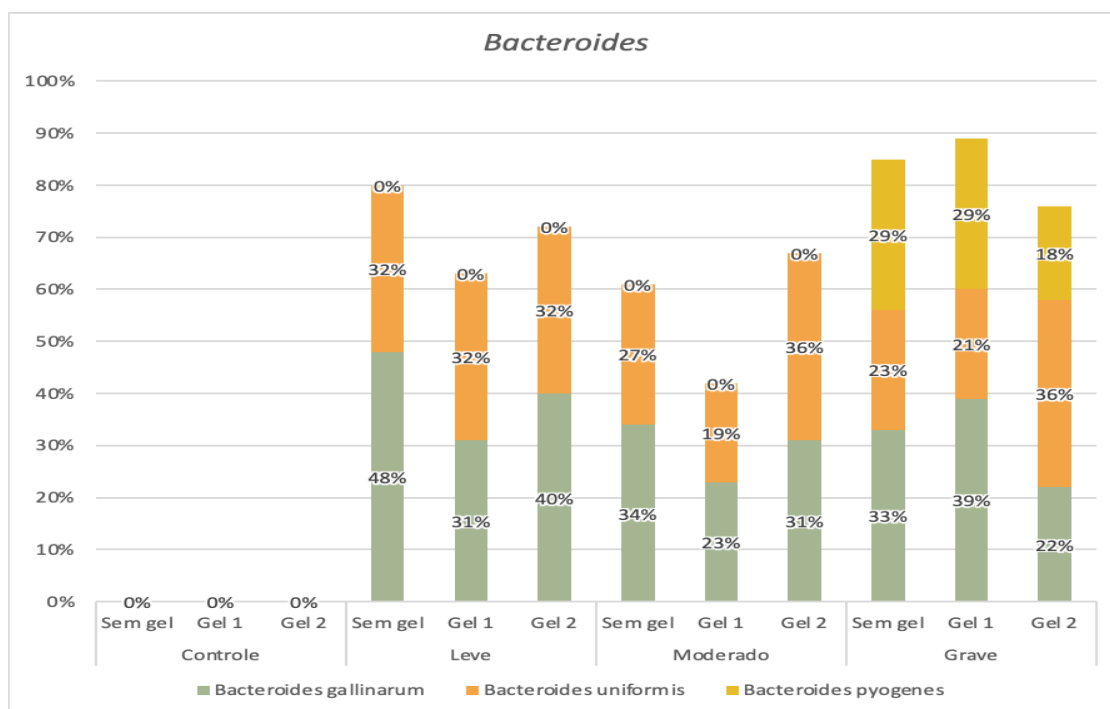
Houve diferença significativa apenas entre as proporções de espécies de bactérias do gênero *Porphyromonas*, no grupo controle entre os não tratados (com 22% da *P. canoris*, 29% da *P. cangingivalis* e 29% da *P. gingivalis*) e tratados após 30 dias (com 9% da *P. canoris*, 33% da *P. cangingivalis* e 15% da *P. gingivalis*), de modo que as *P. canoris* e *P. gingivalis* diminuíram e a *P. cangingivalis* aumentou ( $p=0.007$ ) (Figura 11).



**Figura 11.** Proporção das espécies de bactérias dentro do gênero *Porphyromonas* em cada grupo e em cada período analisado.

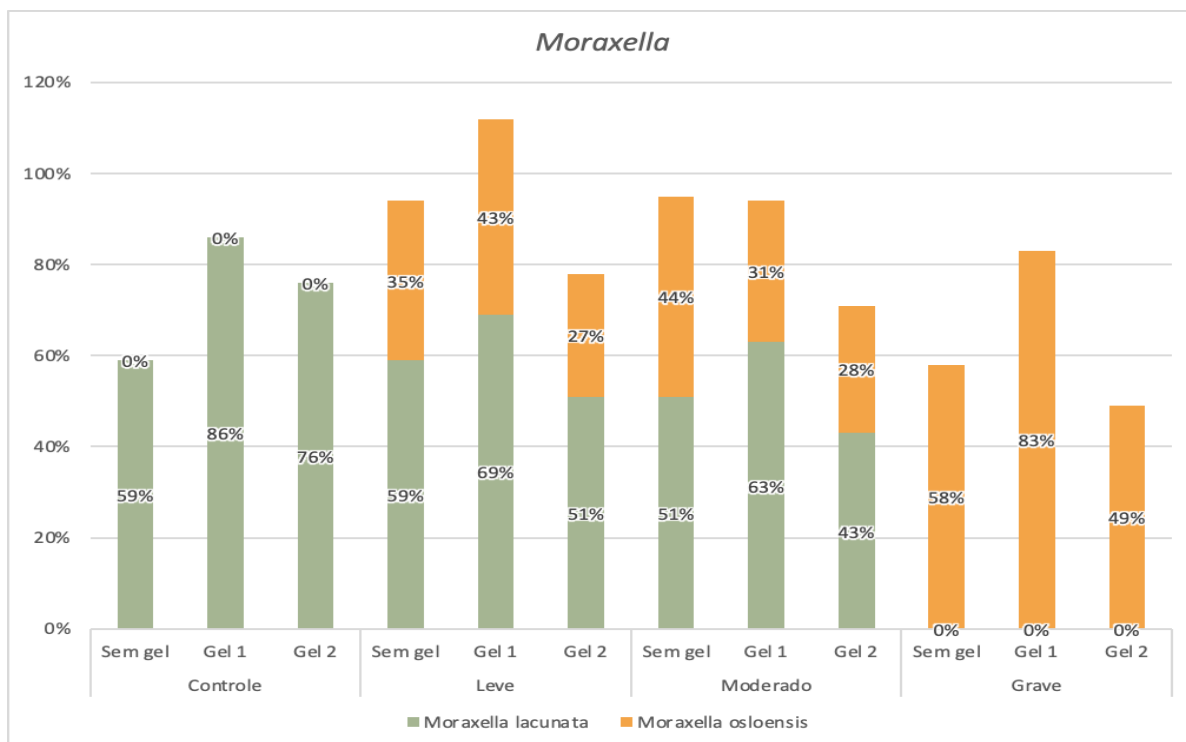
Houve diferença significativa também das proporções de espécies do gênero *Porphyromonas* entre os grupos controle (com 22% da *P. canoris*, 29% da *P. cangingivalis* e 29% da *P. gingivalis*) e com periodontite leve (com 13% da *P. canoris*, 19% da *P. cangingivalis* e 46% da *P. gingivalis*) do grupo sem tratamento, de modo que no grupo controle houve 17% a menos na proporção da *P. gingivalis* e 11% e 10% a mais de *P. canoris* e *P. cangingivalis*, respectivamente ( $p=0.017$ ).

Entre os grupos com doença periodontal leve e grave houve diferença entre as proporções de espécies do gênero *Bacteroides* ( $p<0.001$ ), de modo que quando a infecção foi leve houve 15% a mais de *B. gallinarum* (48% na DP leve e 33% na grave) e 11% a mais da *B. uniformis* (32% na DP leve e 23% na DP grave) (Figura 12). Vale considerar que na infecção grave houve presença de *B. pyogenes* (29%, sem uso de tratamento), porém na análise foram consideradas somente as bactérias existentes nos dois grupos comparados.

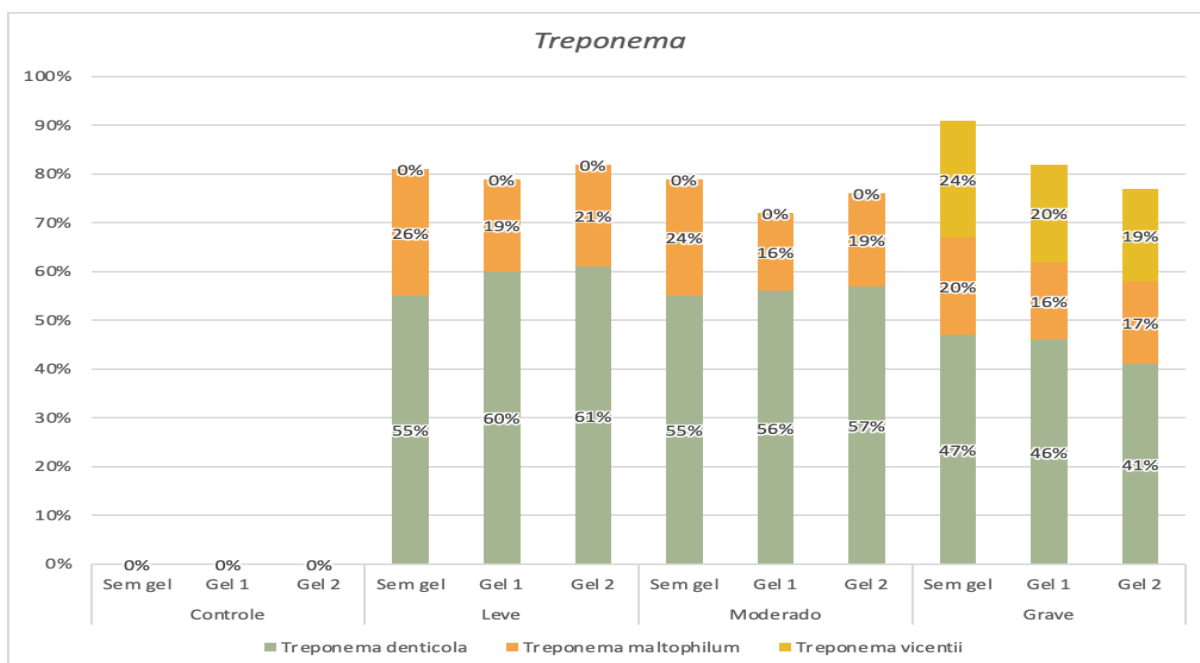


**Figura 12:** Proporção das espécies de bactérias dentro do gênero *Bacteroides* em cada grupo e em cada período analisado.

Não houve diferença significativa nas outras comparações, tanto destes gêneros citados quanto nos outros gêneros em que houve mais de uma espécie encontrada, como *Moraxella* (Figura 13) e *Treponema* (Figura 14). A tabela com os resultados de todas as comparações se encontra no Anexo 3.

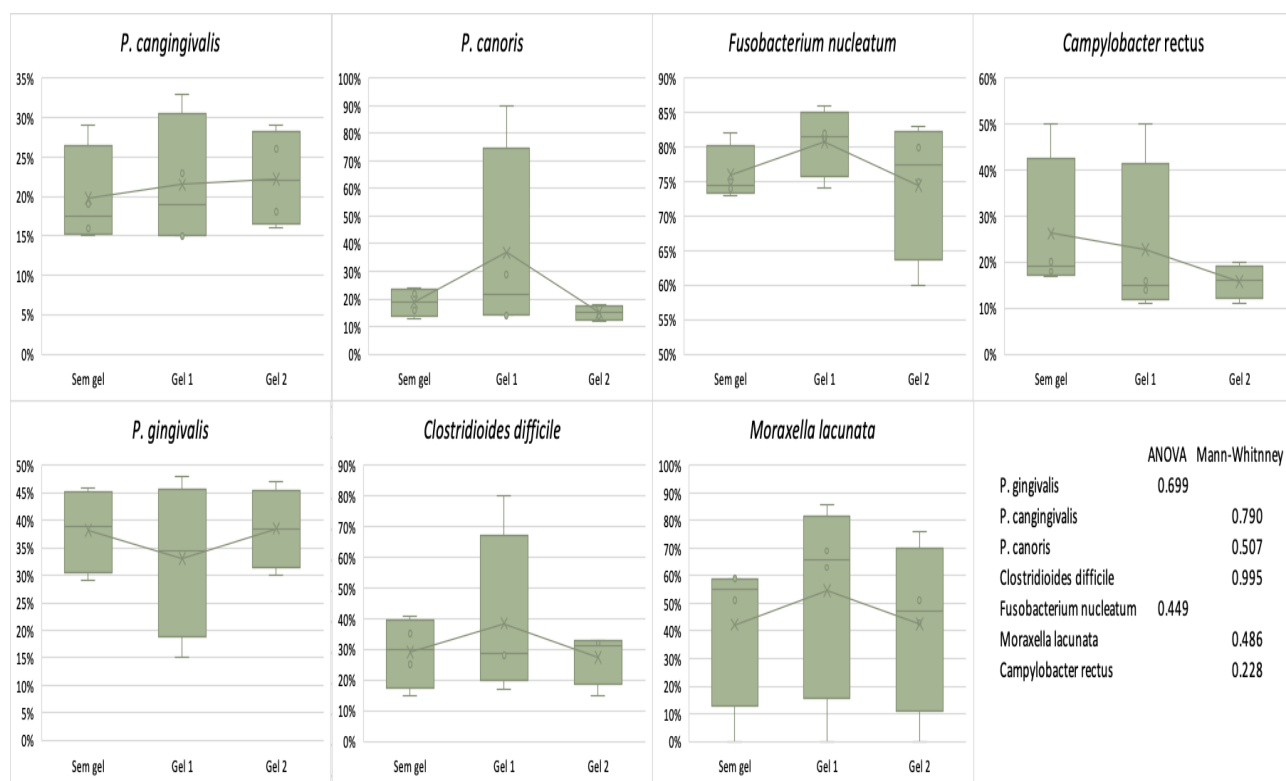


**Figura 13:** Proporção das espécies de bactérias dentro do gênero *Moraxella* em cada grupo e em cada período analisado.



**Figura 14:** Proporção das espécies de bactérias dentro do gênero *Treponema* em cada grupo e em cada período analisado.

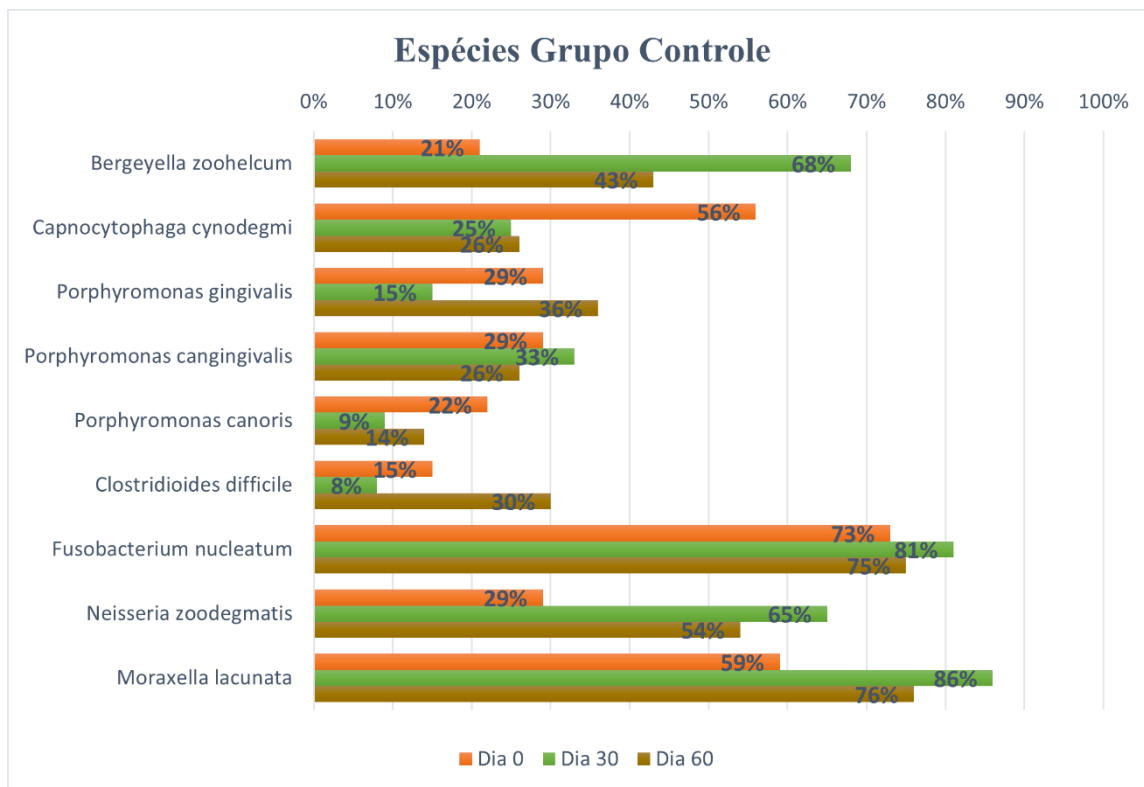
Com relação ao efeito dos tratamentos para as espécies que estavam presentes nos três períodos avaliados não houve diferença estatística entre os períodos e por isso não foram realizadas as análises *post-hoc* (Figura 15). No caso da *Campylobacter rectus*, por exemplo houve diminuição linear de proporção sendo que a média dos grupos variou de 26% (grupo sem tratamento) para 16% (no final do período), entretanto sem significância estatística. Com relação à *P. cangingivalis* houve um discreto aumento de 20% (sem tratamento) para 22% (no meio e final do período). Com relação às outras espécies (*P. canoris*, *F. nucleatum*, *C. difficile* e *M. lacunata*) houve flutuação do valor, sendo que a maioria aumentou em um mês de tratamento e depois diminuiu no mês seguinte, com exceção da *P. gingivalis* que se comportou de forma oposta.



**Figura 15:** Box-plot das porcentagens das espécies nos três períodos avaliados e valores de p das análises estatísticas comparativas (paramétrica: ANOVA e não paramétrica: Mann-Whitney).

Em relação aos tempos de tratamento para o grupo controle, aos 30 dias houve aumento nas porcentagens de *Bergeyella zoohelcum*, *Porphyromonas cangingivalis*, *Neisseria zodegmatis*, *Moraxella lacunata* e para *Fusobacterium nucleatum*, porém todas

elas apresentaram nova redução aos 60 dias usando o tratamento. Já a *Capnocytophaga Cynodegmi* reduziu a porcentagem aos 30 dias e a manteve aos 60 dias. Observou-se também que *P. gingivalis*, *P. canoris* e *Clostridium difficile*, apresentaram redução nos níveis aos 30 dias, porém voltaram a aumentar aos 60 dias de tratamento. Todas as porcentagens estão evidenciadas na Figura 16.

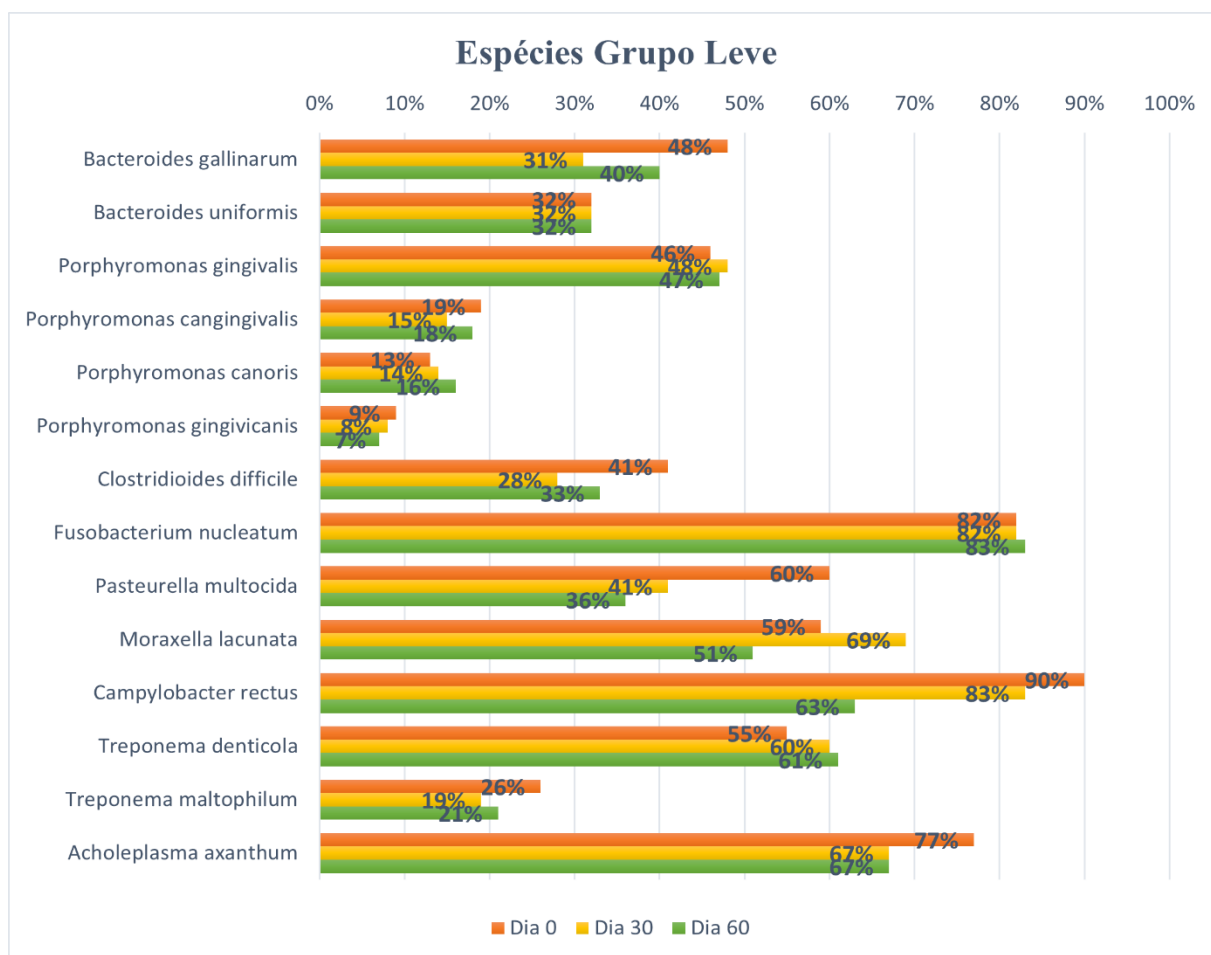


**Figura 16:** Porcentagens das espécies encontradas nos três tempos do grupo controle. Dia 0: corresponde a antes do tratamento, Dia 30: um mês e Dia 60: dois meses de tratamento.

No grupo leve houve redução de porcentagens de *B. gallinarum* e *Clostridium difficile* aos 30 dias de tratamento, voltando a apresentar aumento aos 60 dias. *Moraxella lacunata* apresentou aumento aos 30 dias, voltando a reduzir aos 60 dias. *Pasteurella multocida* e *Campylobacter rectus* foram as espécies que baixaram seus níveis com 30 e 60 dias de tratamento.

As espécies *B. uniformis*, *P. gingivalis*, *P. cangingivalis*, *P. canoris*, *P. gingivicanis* pertencentes ao filo Bacteroidetes e *Fusobacterium nucleatum* do filo Fusobacterium foram as espécies que não modificaram os níveis, ou modificaram discretamente aos 30 e 60 dias. As espécies pertencentes ao gênero *Treponema* (filo

Espiroquetas) também apresentaram leves alterações nas porcentagens, em que *T. denticola* apresentou aumento discreto aos 30 dias, mantendo o nível aos 60 dias. Já *T. maltophilum* e *A. axanthum* (filó Tenericutes) apresentaram redução aos 30 dias, mantendo o nível aos 60 dias. Esses valores podem ser visualizados na Figura 17.

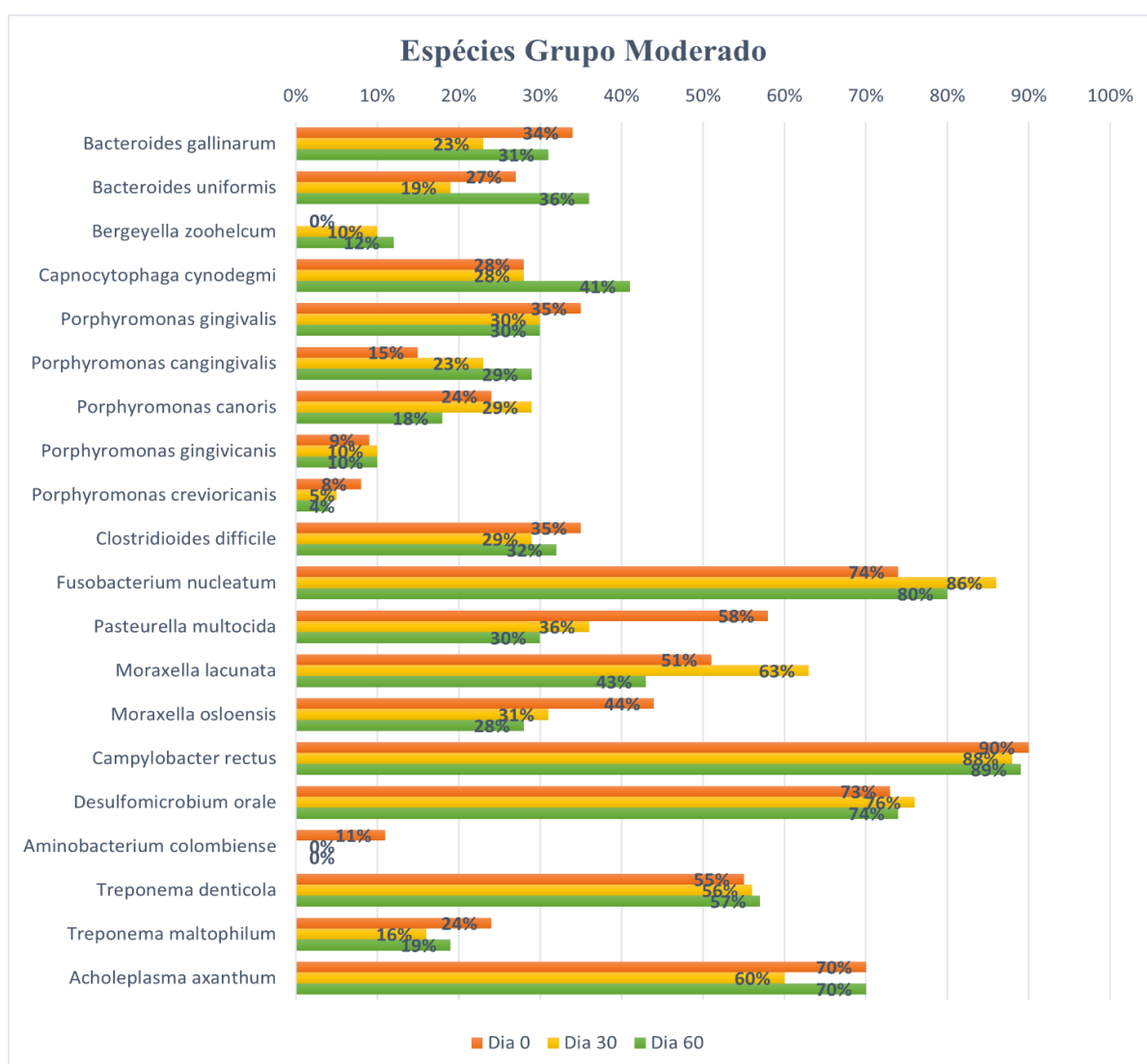


**Figura 17:** Porcentagens das espécies encontradas nos três tempos do grupo com periodontite leve. Dia 0: corresponde a antes do tratamento, Dia 30: um mês e Dia 60: dois meses de tratamento.

No grupo de cães com periodontite moderada observando todas as porcentagens (Figura 18), verificou-se que houve redução nos níveis das espécies pertencentes ao gênero *Bacteroides* aos 30 dias e aumento nos níveis aos 60 dias. *A. axanthum* (filó Tenericutes) e *Clostridium difficile* (filó Firmicutes) seguiram o mesmo padrão. *P. canoris*, *F. nucleatum* e *Moraxella lacunata*, apresentaram aumento nos níveis aos 30

dias, voltando a reduzir aos 60 dias. *P. gingivalis*, *P. crevioricanis*, apresentaram discreta redução em seus níveis em 30 dias, mantendo os níveis aos 60 dias.

*P. gingivicanis*, *Campylobacter rectus*, *Desulfomicrobium orale* e as espécies do gênero *Treponema* mantiveram as porcentagens, ou modificaram discretamente aos 30 e 60 dias de tratamento. As espécies *P. multocida*, *M. oslensis* (filo Protobactérias), *Aminobacterium colombiense* (filo Synergitetes), apresentaram redução nos níveis após 30 e 60 dias de tratamento. Pertencentes ao filo Bacteroidetes os gêneros *Bergeyella*, *Capnocytophaga* e *P. cangingivalis* apresentaram aumento em seus níveis após início do tratamento.

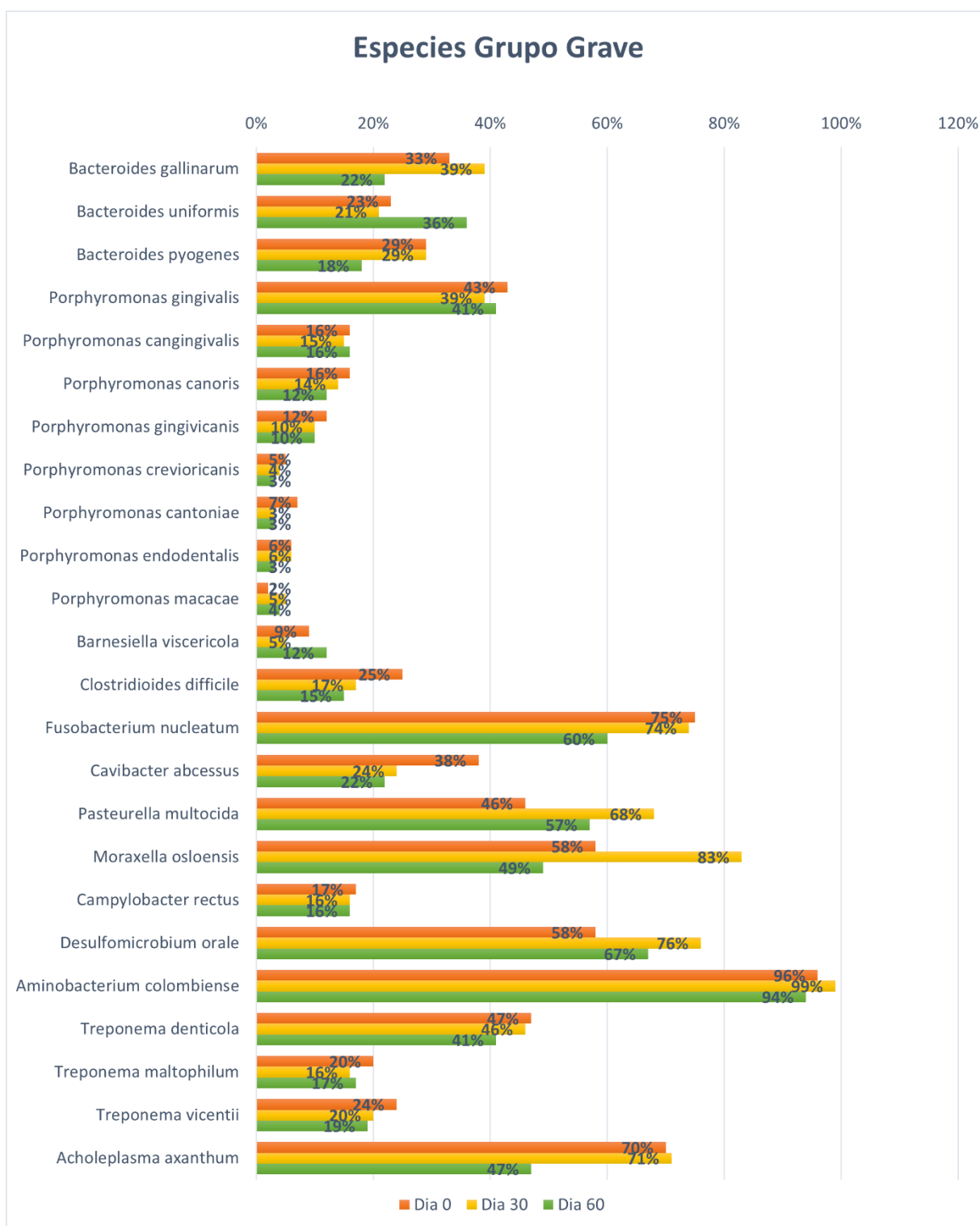


**Figura 18:** Porcentagens das espécies encontradas nos três tempos do grupo com periodontite moderada. Dia 0: corresponde a antes do tratamento, Dia 30: um mês e Dia 60: dois meses de tratamento.



Na Figura 19, foi possível observar o que houve com o grupo de cães com periodontite grave. Ocorreu aumento aos 30 dias de *B. gallinarum* (filo Bacteroidetes), *M. osloensis*, *Desulfomicrobium orale*, *Pasteurella multocida* (filo Protobactéria) e *Aminobacterium colombiense* (filo Synergistetes), reduzindo os níveis aos 60 dias. *P. cangingivalis*, *P. gingivicanis*, *P. crevioricanis* (filo Bacteroidetes) e *Campylobacter rectus* (filo Protobactéria) não apresentaram nenhuma alteração aos 30 ou 60 dias de tratamento. *B. uniformis*, *P. gingivalis* e *Barnesiella viscericola* (filo Bacteroidetes), apresentaram redução aos 30 dias e voltaram a apresentar aumento em 60 dias.

*B. pyogenes*, *P. endodontalis* (filo Bacteroidetes), *Fusobacterium nucleatum* (filo Fusobacterium), *Treponema denticola* (filo Espiroquetas) e *Acholeplasma axanthum* (filo Tenericutes) foram as espécies que apresentaram redução nos níveis apenas aos 60 dias de tratamento. Já as espécies *P. canoris*, *P. cantoniae* (filo Bacteroidetes), *Clostridium difficile* (filo Firmicutes), *Cavibacter abcessus* (filo Fusbacterium), *T. maltophilum* e *T. vicentii* (filo Espiroquetas) apresentaram redução discreta aos 30 dias, mantendo os níveis aos 60 dias. *P. macacae* (filo Bacteroidetes) apresentou aumento aos 30 dias e manteve aos 60 dias.



**Figura 19:** Porcentagens das espécies encontradas nos três tempos do grupo com periodontite grave. Dia 0: corresponde a antes do tratamento; Dia 30: um mês e Dia 60 dois meses de tratamento.

## 6. Discussão

Nesse estudo foram selecionados 18 machos e 22 fêmeas, entre 1 e 14 anos de idade. De acordo com Ruparell et al. (2021) não há relação entre a doença periodontal com o sexo dos animais, nem com a raça, porém há uma relação direta da idade com os casos mais graves da afecção, pois os animais mais velhos apresentam os estágios mais avançados da DP (WALLIS; HOLCOMBRE, 2020). Assim como observado no presente estudo, os cães entre um e quatro anos apresentaram gengiva saudável ou periodontite leve, e os cães acima de cinco anos já apresentavam estágios moderado e grave.

De acordo com McDonald et al. (2014), a microbiota oral canina é dominada por bactérias (99,5%) com apenas uma pequena proporção de arqueas (0,01%) e eucariótico (0,46%). Assim como nesse estudo, Sturgeon et al. (2013) identificaram 13 filos, sendo os mais abundantes Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes, Fusobactérias e Espiroquetas. Já de acordo com Wallis et al. (2021), Firmicutes foram os filos mais abundantes em todas as amostras, seguido por Bacteroidetes e Proteobactérias. Essas afirmações estão de acordo com os dados encontrados.

Foram analisadas apenas as espécies que apresentaram acima de 1000 reads de sequências em pelo menos um dos grupos experimentais. Devido a uma vasta população que é detectada no sequenciamento, foi necessário considerar como parâmetro uma quantidade mínima de leituras no sequenciamento para um resultado mais fidedigno, assim como Ruparell et al. (2021), que também excluíram de seu estudo as espécies com contagens abaixo de 1000 leituras de sequência.

As espécies do gênero *Porphyromonas* sp. foram as mais prevalentes em todos os grupos de tratamento (controle, periodontite leve, moderada e grave), especialmente *P. gingivalis*, *P. cangingivalis*, *P. canoris*. Esses achados corroboram com Davis et al. (2013), Wallis et al. (2015), Wallis et al. (2021), que identificaram várias espécies do gênero *Porphyromonas* em todas as amostras dos animais selecionados em suas pesquisas.

Neste estudo foram identificadas as espécies dos gêneros *Capnocytophaga*, *Bergeyella*, *Porphyromonas*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Fusobacterium* no grupo controle (cães com a cavidade oral saudável). Das bactérias citadas, apenas *Capnocytophaga Cynodegmi* reduziu a porcentagem aos 30 dias, mantendo o mesmo nível aos 60 dias. Entretanto, houve aumento das porcentagens das

bactérias *Bergeyella zoohelcum*, *Porphyromonas cangingivalis*, *Neisseria zodegmatis*, *Moraxella lacunata* aos 30 dias, voltando a reduzir em 60 dias.

Tais resultados estão de acordo com os relatos de Davis et al. (2013) e Holcomb et al. (2014) que afirmaram que a composição de placa de cães jovens com cavidade oral saudável é dominada por táxons dos filos Bacteroidetes que incluem os gêneros *Capnocytophaga*, *Bergeyella* e espécies pertencentes às *Porphyromonas*, assim como espécies do filo Proteobactéria, em que *Neisseria*, *Moraxella* e *Pasteurella* foram os gêneros comuns detectados em cães com boca saudável. Neste estudo, apenas *Pasteurella* não foi identificada no grupo controle. Já os gêneros *Clostridium* e *Fusobacterium* que também foram detectados nesse grupo, geralmente são identificadas em baixa proporção (HOLCOMBRE et al., 2014). Para o gênero *Campylobacter* em nenhum estudo anterior houve relatos da presença dessa espécie em cães com cavidade oral saudável.

As bactérias *Bergeyella zoohelcum*, *Porphyromonas cangingivalis*, *Neisseria zodegmatis*, *Moraxella lacunata* que apresentaram aumento aos 30 dias, reduziram os níveis aos 60 dias. Sugere-se que isso tenha ocorrido provavelmente devido ao aumento de outras bactérias patogênicas que não são relacionadas à boca saudável, como *P. gingivalis*, *P. canoris* (filo Bacteroidetes) e *Clostridium difficile* (Filo Firmicutes), que tiveram redução nos níveis aos 30 dias, porém voltaram a aumentar em 60 dias de tratamento, o que leva a validar os efeitos de resistência e os mecanismos de ativação dos fatores de virulência desses microrganismos, pois *C. difficile* possuem esporos que são resistentes ao calor, ácido e antibióticos (KOCHAN et al., 2017). Já as *Porphyromonas* possuem capacidade em responder e se adaptar em situações de estresse oxidativo sendo esse fator importante para sua virulência (HENRY et al., 2012). Assim, essa bactéria é correlacionado à periodontite crônica e agressiva, por induzir altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6 (GONZALES et al., 2014).

Para o grupo de cães que apresentaram a periodontite leve as espécies pertencentes ao filo Bacteroidetes (gêneros *Bacteroides* e *Porphyromonas*), *Clostridium* (filo Firmicutes), *Fusobacterium* (filo Fusobacteria), gêneros *Moraxella*, *Pasteurella* e *Campylobacter* (filo Protobacteria), espécies pertencentes ao gênero *Treponema* (filo Espiroquetas) e gênero *Acholeplasma* (filo Tenericutes) foram identificadas.

Assim como nesse estudo, essas espécies foram associadas à progressão da periodontite, ocorrendo aumento da presença de *Clostridium*, *Porphyromonas* sp. e de *Treponema* sp. nos estudos de Wallis et al. (2015). Oba et al., (2021) por sua vez, identificaram *Porphyromonas* sp. e *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Moraxella*,

*Acholeplasma* em amostras subgingivais de cães com periodontite leve. Esses achados também corroboram com os de Davis et al. (2013), que observaram maiores proporções de Espiroquetas, Sinergistetes e Firmicutes à medida que ocorria a progressão de gengivite para periodontite.

A espécie *Fusobacterium nucleatum* assim como a maioria das espécies do filo Bacteroidetes não apresentaram alteração nas porcentagens aos 30 ou 60 dias de tratamento, apenas a espécie *B. gallinarum* apresentou redução em 30 dias, voltando a aumentar aos 60 dias, assim como *Clostridium difficile* que apresentou o mesmo padrão. *T. denticola*, a espécie de maior proporção do gênero *Treponema* aos 30 dias de tratamento aumentou, mantendo os níveis aos 60 dias. Já a *T. maltophilum* assim como *A. axanthum* (filo Tenericutes) apresentaram redução aos 30 dias, mantendo as porcentagens aos 60 dias de tratamento.

Essas espécies detectadas neste e em estudos anteriores, apresentam esse tipo de comportamento devido sua patogenicidade e seus mecanismos de adaptação, pois *Fusobacterium nucleatum* está fortemente associado à formação de biofilme e tem capacidade de agregação com outras espécies (AMANO, 2010), além de serem resistentes a antibióticos, devido à presença de beta-lactamase (VOHA, et al., 2006). Tanto essa adesão, quanto a invasão são mecanismos essenciais para a colonização, disseminação e indução de respostas inflamatórias na cavidade oral (STRAUSS et al., 2011).

As espécies do gênero *Treponema* que é identificada frequentemente nas bolsas periodontais, são muito resistentes e iniciam a desregulação da inflamação e da homeostase dos tecidos (KAUSHIK et al., 2015; MOHANTY et al., 2019) pois, o potencial patogênico das espiroquetas se dá devido ao fato de liberarem endotoxinas que produzem destruição tecidual pelos efeitos tóxicos diretos ou indiretos, pela ativação e modificação da resposta tecidual do hospedeiro (INAGAKI et al., 2016).

Como foi possível observar *Clostridium difficile* também ativa seus mecanismos de resistência após um período de tratamento, pois seus esporos são resistentes ao calor, ácido e antibióticos (KOCHAN et al., 2017). Dessa forma, com o início do tratamento, sugere-se que ocorre desequilíbrio dos outros microrganismos, assim *C. difficile* começa a colonizar e dominar os tecidos na cavidade oral (LEFFLER; LAMONT, 2015). Já os Bacteroidetes especialmente as *Porphyromonas* e os *Bacteroides* ativam a autofagia celular para sobreviver, replicar dentro da célula e impedir a apoptose, tornando-os altamente resistentes a antibióticos e a antissépticos (BELANGER et al., 2006; NAGY et al., 2018).

*Pasteurella multocida* e *Campylobacter rectus* baixaram as porcentagens aos 30 e 60 dias utilizando o gel. *Pasteurella* é um microrganismo com potencial atividade zoonótica podendo ser transmitida aos humanos através da mordida de animais (DEWHIRST et al., 2012; STURGEON et al., 2013), assim o fato dessa bactéria ter seus níveis reduzidos com 30 e 60 dias de tratamento é de extrema importância. *Campylobacter* está envolvida na periodontite inicial assim como na periodontite crônica e seus níveis terem diminuído pode ser devido ao fato de não apresentarem atividade de beta-lactamase que confere resistência aos demais microrganismos (BLANDINO et al., 2007).

Assim como no grupo controle, *Moraxella lacunata* nesse grupo de periodontite leve, também apresentou aumento em seus níveis em 30 dias, o que sugere eficácia do gel, já que essa bactéria está associada à saúde oral (DAVIS et al., 2013; HOLCOMBRE et al., 2014), porém diminuiu os níveis aos 60 dias, o que pode estar relacionado ao aumento das bactérias patogênicas.

Galimanas et al. (2014) verificaram que no sequenciamento Illumina a maioria das OTUs é compartilhada entre boca saudável e doença periodontal, com pequenas diferenças. Comparando ao estudo aqui apresentado, é possível afirmar que as OTUs tiveram pouca ou nenhuma variação em relação aos filos e gêneros, porém houve grande variação em relação às espécies, sendo detectadas menor proporção de espécies para animais com boca saudável em relação a quantidade de espécies detectadas na periodontite avançada. Esses dados encontrados corroboram com a afirmação de Davis et al. (2013), de que é comum as amostras de animais com cavidade oral saudável conter significativamente menos espécies do que os animais que apresentam gengivite e periodontite.

Periodontite avançada ou crônica provavelmente é o termo utilizado para definir os estágios moderado e grave da doença periodontal de cães, já que em estudos anteriores não foram realizadas a identificação microbiológica da cavidade oral de animais com as formas mais graves dessa infecção separando esses dois estágios. No presente estudo, nos grupos de cães com periodontite moderada e grave, a maioria dos gêneros identificados foram os mesmos com exceção de *Bergeyella* e *Capnocytophaga*, identificados apenas no estágio moderado e os gêneros *Cavibacter* e *Barnesiella* detectado apenas no grupo com periodontite grave. Os gêneros *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Moraxella*, *Campylobacter*, *Desulfomicrobium*, *Treponema*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Acholeplasma* e *Aminobacterium*, foram identificados em ambos os grupos. Esses

gêneros já haviam sido identificados em estudos anteriores em cães com periodontite avançada (RIGGIO et al., 2011; WALLIS et al., 2015; WALLIS et al., 2021; RUPARELL et al., 2021).

Neste estudo foi possível verificar que as maiores taxas de detecção nos grupos de cães com periodontite moderada e grave, foram as espécies de Bacteroidetes (gêneros *Porphyromonas* sp. e *Bacteroides* sp., seguido de Espiroquetas (*Treponema* sp.) e Protobactéria (*Moraxella* sp.). No estudo realizado por Riggio et al. (2011) foram identificadas Bacteroidetes (*Porphyromonas canoris* e *Capnocytophaga cynodegmi*) e *Actinomyces* sp. (filo Actinobactéria) em periodontite moderada. Nos achados de Wallis et al. (2021) das OTUs associadas com periodontite mais avançada a maioria pertencia ao filo Firmicutes, seguido por Bacteroidetes (várias espécies de *Porphyromonas*) Espiroquetas (*Treponema denticola*) e Actinobacterias. No estudo de Wallis et al. (2015) as Espiroquetas tiveram uma abundância maior em cães com a periodontite avançada. Todos esses dados corroboram com os achados deste estudo, exceto quanto à identificação do filo Actinobactéria em que não foram identificadas OTUs com sequências de leitura suficientes.

No grupo de cães com periodontite moderada observou-se redução nos níveis das espécies pertencentes ao gênero *Bacteroides* (filo Bacteroidetes), *A. axanthum* (filo Tenericutes) e *Clostridium difficile* (filo Firmicutes) aos 30 dias, sugerindo que logo depois ocorreu adaptação desses microrganismos, indicado pelo aumento ou manutenção dos níveis de porcentagem aos 60 dias. Para as espécies *P. canoris*, *F. nucleatum* e *Moraxella lacunata*, apesar de apresentarem aumento em 30 dias após início do tratamento, observou-se redução aos 60 dias.

Para *P. gingivalis* e *P. crevioricanis*, houve discreta redução em seus níveis aos 30 dias, mantendo os níveis aos 60 dias. As espécies *P. multocida*, *M. oslensis* (filo Protobactérias), *Aminobacterium colombiense* (filo Synergitetes), apresentaram redução nos níveis aos 30 e 60 dias, sugerindo eficácia após início do tratamento para essas espécies. Já para *P. gingivicanis*, *Campylobacter rectus*, *Desulfomicrobium orale* e as espécies do gênero *Treponema* por não terem apresentado alterações em seus níveis aos 30 e 60 dias de tratamento, o tratamento não foi eficaz. Pertencentes ao filo Bacteroidetes os gêneros *Bergeyella*, *Capnocytophaga* e *P. cangingivalis* apresentaram aumento em seus níveis após início do tratamento, o que valida o efeito do tratamento, devido ao fato dessas bactérias estarem presentes em abundância na cavidade oral saudável.

No grupo de cães com periodontite grave, *P. gingivicanis*, *Campylobacter rectus*, *P. cangingivalis*, *P. crevioricanis*, *Desulfomicrobium orale* e as espécies do gênero *Treponema*, mantiveram as porcentagens aos 30 e 60 dias de tratamento, assim como para *P. macacae* que apresentou aumento aos 30 dias, demonstrando que para esse grupo de bactérias o tratamento não foi eficaz.

Apesar de ter ocorrido aumento aos 30 dias de *B. gallinarum* (filo Bacteroidetes), *M. osloensis*, *Desulfomicrobium orale*, *Pasteurella multocida* (filo Protobactéria) e *Aminobacterium colombiense* (filo Synergistetes), sugere-se eficácia do tratamento aos 60 dias, pelo fato dessas bactérias terem apresentado redução. Também para as espécies *B. pyogenes*, *P. endodontalis* (filo Bacteroidetes), *Fusobacterium nucleatum* (filo Fusobacterium), *Treponema denticola* (filo Espiroquetas) e *Acholeplasma axanthum* (filo Tenericutes) a redução nos níveis ocorreu apenas aos 60 dias de tratamento. Já as espécies *P. canoris*, *P. cantoniae* (filo Bacteroidetes), *Clostridium difficile* (filo Firmicutes), *Cavibacter abcessus* (filo Fusobacteria), *T. maltophilum* e *T. vicentii* (filo Espiroqueta) apresentaram redução aos 30 dias, mantendo os níveis aos 60 dias, sugerindo a eficácia do tratamento para essas espécies.

Identificadas em maior proporção nesses grupos de animais com estágios avançados da periodontite, *Aminobacterium* em conjunto com outros gêneros é responsável pela fermentação e liberação de acetato e H<sub>2</sub> (BAENA et al., 2000), o que sugere um auxílio na produção de intensa halitose. Entretanto, o gênero *Desulfomicrobium* é de fato o responsável desenvolvimento do mau hálito, uma vez que desenvolve atividade proteolíticas na boca. Além disso, esse gênero está associado ao aumento da profundidade das bolsas periodontais e sangramento (KUSHKEVYCH et al., 2019), pois o aumento dessas bactérias nas bolsas periodontais produz o fator de virulência que potencializa o processo de destruição do tecido (KUSHKEVYCH et al., 2018).

Identificadas apenas nos animais com periodontite grave, não se tem até o momento informações relacionadas às *P. crevioricanis*, *P. endodontalis* e *P. macacae*, *Cavibacter abcessus* e *Barnesiella viscericola*, já que essas espécies não foram identificadas em estudos anteriores relacionados à doença periodontal, nem se sabe quais funções elas exercem para o agravamento desta afecção.

Nesses grupos de cães com periodontite avançada, a maioria das bactérias foram resistentes, mesmo apresentando redução dos valores, aos 30 ou 60 dias de tratamento, os níveis voltavam a aumentar, ou começavam a baixar aos 60 dias. Se houvesse mais tempo



de tratamento seria possível observar melhor o padrão de comportamento das espécies identificadas. Pode-se afirmar também que pelo fato de serem os estágios mais avançados o nível de patogenicidade das bactérias modifica, tornando-as mais resistentes ao tratamento.

Neste estudo verificou-se aumento de *Moraxella lacunata*, *Bergeyella*, *Capnocytophaga* e *P. cangingivalis*, cujas espécies são encontradas na cavidade oral saudável, em 30 dias após início do tratamento no grupo moderado, indicando bom efeito do tratamento. No estudo de Wallis et al. (2015), houve mudanças evidentes nas proporções de *Bergeyella zoohelcum*, *Moraxella* sp., *Capnocytophaga cynodegmi*, *Neisseria* e *Pasteurella* que diminuíram proporcionalmente à medida que os cães desenvolviam a periodontite. Esses achados estão de acordo com os resultados apresentados neste estudo, pois no grupo grave, das bactérias relacionadas à saúde oral, apenas *P. cangingivalis* foi detectada e não apresentou alteração de porcentagens após tratamento, as demais espécies não foram identificadas.

A alta abundância de espécies associadas à saúde oral pode resultar em uma comunidade menos propensa a induzir periodontite, o que leva a sugerir que essas espécies sejam bem adaptadas a não induzir a resposta inflamatória do hospedeiro (DAVIS et al., 2013; WALLIS et al., 2015). Verificou-se que nos estágios mais graves, aumenta a proporção de espécies, o que realmente é uma resposta ao avanço da periodontite. Assim, a progressão dos estágios leves para os estágios graves, podem ser desencadeados como uma resposta à comunidade bacteriana como um todo.

Em humanos o biofilme inicial está associado à presença de bactérias Gram-positivas, sendo estas relacionadas a cavidade oral saudável, enquanto em cães bactérias Gram negativas são associadas à saúde (STURGEON et al., 2013; DAVIS et al., 2013).

## Conclusão

Concluiu-se que o uso do gel não alterou no número de OTUs em relação à gêneros e espécies bacterianas identificadas em cada grupo experimental, antes do tratamento e aos 30 e 60 dias de tratamento. Isso pode ter ocorrido provavelmente devido à resistência de vários microrganismos a antissépticos, assim como a capacidade de adaptação ao meio e o grau de patogenicidade deles que foram observados em todos os estágios da doença periodontal. Entretanto, houve redução nos níveis de bactérias patogênicas dos gêneros *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Pasteurella* e várias espécies de *Porphyromonas* aos 60 dias nos grupos de cães com boca saudável e com periodontite leve e moderada. Relacionadas à saúde oral, o aumento nos níveis das espécies de *Bergeyella zoohelcum*, *Porphyromonas cangingivalis* e *Moraxella lacunata* após início do tratamento, também foram observadas em todos os grupos, exceto nos animais com periodontite grave.

Para os cães com cavidade oral saudável, periodontite leve e moderada a resposta ao antisséptico foram melhores, comparados ao grupo de cães com periodontite grave. Isso leva a sugerir que para esse grupo específico, a resposta ao tratamento seria melhor se o gel fosse utilizado como método preventivo após limpeza periodontal como forma de evitar o agravamento da afecção.

## Referências

ABAYASEKARA, L.M.; PERERA, J. CHANDRASEKHARAN, V. et al. Detection of bacterial pathogens from clinical specimens using conventional microbial culture and 16S metagenomics: a comparative study. **Bmc infect dis**, v. 17, n. 631. p. 1-9. 2017. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2727-8>.

ABIKO, Y. NAGANO, K. YOSHIDA, Y. YOSHIMURA, F. Characterization of *Treponema denticola* mutants defective in the major antigenic proteins, Msp and TmpC. **Plos One**, v. 9. n. 11, e113565, 2014. Doi: 10.1371/journal.pone.0113565.

ADEPU, R. RAGHAVENDER, K.B.P. GIREESH, K. V. RAMESH, N. A clinical study on the incidence of periodontal diseases in dogs and their surgical management. **Pharma Innov**, v. 7, n. 4, p. 290-292, 2018.

AHMAD, T. GUPTA, G. SHARMA, A. KAUR, B. EL-SHEIKH, M.A. ALYEMENI, M.N. Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of bacterial communities of a Himalayan urban fresh water lake. **Plos One**, v. 16 n.3 e0248116. 2021. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248116>.

ALLALI, I. ARNOLD, J.W. ROACH, J. et al. A comparison of sequencing platforms and bioinformatics pipelines for compositional analysis of the gut microbiome. **BMC Microbiol**, v. 17. n. 194, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1101-8>.

AMANO, A. Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. **J Periodontol**, v. 74, n. 1, p. 90–96, 2003.

AMERICAN VETERINARY DENTAL COLLEGE, 2016. Veterinary Dental Nomenclature – Recommendations from the AVDC Nomenclature Committee Adopted by the AVDC Board. <http://www.avdc.org/Nomenclature.pdf>. Acesso em: 03 de Agosto de 2021.

ANDROGA, G.O HART, J. FOSTER, N.F. et al. Infection with toxin A-negative, toxin B-negative, binary toxin-positive *Clostridium difficile* in a young patient with ulcerative colitis. **J Clin Microbiol**. v. 53. p. 3702–3704, 2015.

ANTEZACK, A. BOXBERGER, M. LA SCOLA, B. MONNET-CORTI, V. Isolation and Characterization of *Capnocytophaga bilenii* sp. nov., a Novel *Capnocytophaga* Species Detected in a Gingivitis Subject. **Pathogens**, v. 10, n. 547. p. 1-13, 2021 Doi: <https://doi.org/10.3390/pathogens10050547>.

BAENA, S. FARDEAU, M.L. LABAT, M. OLLIVIER, B. GARCIA, J.L. PATEL, B.K.C. *Aminobacterium mobile* sp. nov., a new anaerobic amino-acid-degrading bacterium. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 50. p. 259-264, 2000.

BAILIE, W. E. STOWE, E. C. SCHMITT, A. M. Aerobic bacterial flora of oral and nasal fluids of canines with reference to bacteria associated with bites. **J. Clin. Microbiol**, v. 7. P. 223–231, 1978. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC274896>. Acesso em: setembro de 2021.

BAKTASH, A. TERVEER, E.M. ZWITTINK, R.D. et al. Mechanistic insights in the success of fecal microbiota transplants for the treatment of *Clostridium difficile* infections. **Front Microbiol**, v. 9. p. 12 - 42, 2018.

BELANGER, M. RODRIGUES, P.H. DUNN JR, W. A. PROGULSKE- FOX, A. Autophagy: a highway for *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells, **Autophagy**, v. 2. n. 3, p. 165–170, 2006.

BELTRAN, A. BDIIWI, S. JANI, J. RECCO, R.A. GO, E.E. ZAMAN, M.M. A case of *Bergeyella zoohelcum* bacteremia after ingestion of a dish prepared with goat blood. **Clin Infect Dis**, v. 42. p. 891–892, 2006.

BENNO, Y. WATABE, J. MITSUOKA, T. *Bacteroides pyogenes* sp. nov., *Bacteroides suis* sp. nov., and *Bacteroides helcogenes* sp. nov., new species from abscesses and feces

of pigs. **Syst Appl Microbiol.** v. 4. p. 396–407, 1983. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(83\) 80024-1](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(83) 80024-1).

BERENGER, B.M. CHUI, L. BORKENT, A. LEE, M.C. Anaerobic urinary tract infection caused by *Veillonella parvula* identified using cystine-lactose-electrolyte deficient media and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **ID Cases**, v. 2. p. 44–46, 2015.

BLANDINO, G. I. MILAZZO, D. FAZIO, S. PUGLISI, M. PISANO, A. SPECIALE, S. Antimicrobial susceptibility and beta-lactamase production of anaerobic and aerobic bacteria isolated from pus specimens from orofacial infections. **J. Chemother.** v. 19. p. 495–499, 2007.

BLOOR, C. Oral homecare regimens and products. **Vet. Nurse J**, v. 6, n. 9, p. 522-530. 2015.

BOBO, R.A. NEWTON, E. J. A previously undescribed gram-negative bacillus causing septicemia and meningitis. **Am J Clin Pathol**, v. 65. V. 4 p. 564–569, 1976.

BOOPATHY, R. ROBICHAUX, M. LAFONT, D. HOWELL, M. Activity of Sulfate-Reducing Bacteria in Human Periodontal Pocket. **Can. J. Microbiol**, v. 48. p. 1099–1103, 2002.

BROOK, I. Spectrum and treatment of anaerobic infections. **J Infect Chemother**, v. 22. p. 1–13, 2016. Doi:<https://doi.org/10.1016/j.jiac.2015. 10.0104>.

CARREIRA, L.M.; DIAS, D.; AZEVEDO, P. Relationship between gender, age, and weight and the serum ionized calcium variations in dog periodontal disease evolution. **Top Comp Anim Med**, v. 30, n.2, p. 51-56, 2015.

CLAIS, S. BOULET, G. KERSTENS, M. et al. Importance of biofilm formation and dipeptidyl peptidase IV for the pathogenicity of clinical *Porphyromonas gingivalis* isolates. **Pathog. Dis**, v. 70. n. 3. P. 408- 413, 2014.

CERNÝ, M. VÍTEZOVÁ, M. VÍTEZ, T. BARTOS, M. KUSHKEVYCH, I. Variation in the distribution of hydrogen producers from the clostridiales order in biogas reactors depending on different input substrates. **Energies**, v. 11. p. 3270, 2018.

CHERTKOV, O. SIKORSKI, J. BRAMBILLA, E. LAPIDUS, A. COPELAND, A. et al. Complete genome sequence of *Aminobacterium colombiense* type strain (ALA-1T). **Stand. Genom. Sci**, v.2. p. 280-289, 2010. Doi:10.4056/sigs.902116

CHU, L. WU, Y. XU, X. PHILLIPS, L. KOLODRUBETZ, D. Glutathione catabolism by *Treponema denticola* impacts its pathogenic potential. **Anaerobe**, v. 62. 2020. Doi: 102170. 10.1016/j.anaerobe.2020.102170.

CUNHA, F. JEON, S.J. JEONG, K.C. GALVÃO, K. N. Draft genome sequences of *Bacteroides pyogenes* strains isolated from the uterus of holstein dairy cows with metritis. **Microbiol Resour Announc**, v. 8. e01043-e11019, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1128/MRA.01043-19>.

DAHLEN, G. PREUS, H. R. Low antibiotic resistance among anaerobic Gram-negative bacteria in periodontitis 5 years following metronidazole therapy. **Anaerobe**. v. 43. p. 94–98, 2017. 10.1016/j.anaerobe.2016.12.009.

DAVIS, I. J. WALLIS, C. DEUSCH, O. COLYER, A. MILELLA, L. LOMAN, N. HARRIS, S. A Cross-Sectional Survey of Bacterial Species in Plaque from Client Owned Dogs with Healthy Gingiva, Gingivitis or Mild Periodontitis. **Plos One**, v.8. n. 12. p. 1-12, 2013.

DE BOEVER, E.H. LOESCHE, W.J. Assessing the Contribution of Anaerobic Microflora of the Tongue to Oral Malodor. **J. Am. Dent. Assoc.** v. 126. P .1384–1393, 1995.

DEWHIRST.F. E. KLEIN, E. A. THOMPSON, E. C. BLANTON, J.M. CHEN, T. et al. The Canine Oral Microbiome. **Plos one**. V. 7 n. 4. e36067. Doi:10.1371/ journal.pone.0036067

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26. n. 19,p. 2460–2461. 2010 Doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461806/ej.17.1.200>

FARDINI, Y. WANG, X. TEMOIN, S. NITHIANANTHAM, S. LEE, D. SHOHAM, M. HAN, Y.W. Fusobacterium nucleatum adhesin FadA binds vascular endothelial cadherin and alters endothelial integrity. **Mol Microbiol**. v. 82. p. 1468–1480, 2011.

FERNANDES, N. A. BORGES, A. P. B. REIS, E.C.C. SEPÚLVEDA, R.V. PONTES, K. C. S. Prevalence of periodontal disease in dogs and owners' level of awareness - a prospective clinical trial. **Rev Ceres**, v. 59, n. 4, p. 446-451, 2012.

FIELD, C. A. GIDLEY, M.D. PRESHAW, P.M. JAKUBOVICS, N. Investigation and quantification of key periodontal pathogens in patients with type 2 diabetes. **J Periodontal Res**, v. 47. p. 470–478, 2012.

FONSECA, S. A. GALERA, P.D. BRITO, D.L. SIMONE, SILVA, P.A.I. CARDOSO, L.B. MARÇOLA, T.G. DRUMMOND, V.O. PIMENTEL, C.M. Análise microbiológica da placa bacteriana da doença periodontal em cães e o efeito da antibioticoterapia sobre ela. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1424-1429, 2011.

FRANÇA, L. F. C. VASCONCELOS, A. C. C. G. SILVA, F.R.P. ALVES, E. H. P. CARVALHO, J.S. et al. Periodontitis changes renal structures by oxidative stress and lipid peroxidation. **J. clin. periodontol**, v. 44, n. 6, p. 568-576, 2017.

GALIMANAS, V. HALL, M.W. SINGH, N. LYNCH, M.D. GOLDBERG, M. TENENBAUM, H. CVITKOVITCH, D.G. NEUFELD, J.D. SENADHEERA, D.B. Bacterial community composition of chronic periodontitis and novel oral sampling sites for detecting disease indicators. **Microbiome**, v. 2. n. 32, p. 1-13, 2014.

GOLDSTEIN, E.J.C. CITRON, D.M. TYRRELL, K.L. LEONCIO, E. MERRIAM, C.V. Comparative in vitro activity of omadacycline against dog and cat bite wound isolates. **Antimicrob Agents Chem.** v. 62. e02551-e12517, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.02551-17>.

GONZALES, J. R. GROEGER, S. JOHANSSON, A. MEYLE, J. T helper cells from aggressive periodontitis patients produce higher levels of interleukin-1 beta and interleukin-6 in interaction with *Porphyromonas gingivalis*. **Clin Oral Investig**, v.18. n. 7. p. 1835-1843, 2014.

GUALBERTO, N.G.S. ANDRADE, L.P.O. ANDRADE, C.F.O. AMBRÓSIO, P.E. WENCESLAU, A.A. SILVA, E.B. LAVOR, M.S.L. CARLOS, R.S.A. Evaluation of the prophylactic action of veterinary dental gel containing *Aloe vera* and green tea on calculus formation in dogs submitted to periodontal treatment. **Acta Vet Bras**, v. 16.n. 1. p. 41-46, 2022.

GUPTA, R. K. GUPTA, D. BHASKAR, D. J. YADAV, A. OBAID, K. MISHRA, S. Preliminary Antiplaque Efficacy of Aloe Vera Mouthwash on 4 Day Plaque Re-Growth Model: Randomized Control Trial. **Ethiop J Health Sci**, v. 24.n.2.p.139-144, 2014.

HAMBIRE, C. U. JAWADE, R. PATIL, A. WANI, V. R. KULKARNI, A. A. NEHETE, P. B. Comparing the antiplaque efficacy of 0.5% Camellia sinensis extract, 0.05% sodium fluoride, and 0.2% chlorhexidine gluconate mouthwash in children. **J Int Soc Prev Community Dent**, v. 5. n. 3 p. 218-260, 2015.

HAN, Y. W. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. **Curr Opin Microbiol**, v. 0. P. 141–147, 2015.

HARPER, M. BOYCE, J. D. ADLER, B. Pasteurella multocida pathogenesis: 125 years after Pasteur. **FEMS Microbiol Lett**, v. 265. P. 1–10, 2006. Doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00442.x.



HARPER, M. JOHN, M. TURNI, C. EDMUNDS, M. ST MICHAEL, F. ADLER, B. Development of a rapid multiplex PCR assay to genotype *Pasteurella multocida* strains by use of the lipopolysaccharide outer core biosynthesis locus. **J. Clin. Microbiol.** v. 53. p. 477–485, 2015. Doi: 10.1128/JCM.02824-14.

HENRY, L. G. MCKENZIE, R. M. E. ROBLES, A. FLETCHER, H. M. Oxidative stress resistance in *Porphyromonas gingivalis*. **Fut Microbiol**, v. 7, n. 4, p. 497–512, 2012.

HOLCOMBE, L. J. PATEL, N. COLYER, A. DEUSCH, O. O'FLYNN, C. HARRIS, S. Early Canine Plaque Biofilms: Characterization of Key Bacterial Interactions Involved in Initial Colonization of Esmalte. **Plos One**, v. 9. n. 12. e113744. 2014. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113744>.

HUSON, D. H. AUCH, A.F. QI, J. SCHUSTER, S.C. MEGAN analysis of metagenomic data. **Gen Res**, v.17.p.377–386, 2007. Doi: <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.5969107>.

ILLUMINA, Disponível em: <http://www.illumina.com/>. Acesso em: 28 de junho de 2021.

INAGAKI, S. KIMIZUKA, R. KOKUBU, E. SAITO, A. ISHIHARA, K. *Treponema denticola* invasion into human gingival epithelial cells. **Microbial Pathog**, v. 94. p. 104–111, 2016. Doi: 10.1016/j.micpath.2016.01.010.

JACINTO, R.C. MONTAGNER, F. SIGNORETTI, F.G. ALMEIDA, G.C. GOMES, B.P. Frequency, microbial interactions, and antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* isolated from primary endodontic infections. **J Endod**. v. 34. n. 12. p. 1451-1456, 2008. Doi: 10.1016/j.joen.2008.08.036.

JEON, S.J. CUNHA, F. MA, X. MARTINEZ, N. VIEIRA-NETO, A. DAETZ, R. et al. Uterine microbiota and immune parameters associated with fever in dairy cows with metritis. **Plos One**, v. 11. e0165740, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165740>.

JEON, Y. S. PARK, S.C. LIM, J. CHUN, J. KIM, B. S. Improved pipeline for reducing erroneous identification by 16S rRNA sequences using the Illumina MiSeq platform. **Microbiol J**, v.53, n.1, p.60-69, 2015.

JUN, H.K. JUNG, Y.J. CHOI, B.K. *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythia* induce cell death and release of endogenous danger signals. **Arch Oral Biology**, v. 73. p. 72–78, 2017. Doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.09.010.

KAPLAN, A. KAPLAN, C.W. HE, X. MCHARDY, I. SHI, W. LUX, R. Characterization of aid1, a novel gene involved in *Fusobacterium nucleatum* interspecies interactions. **Microb Ecol**. V. 68. p. 379–387, 2014.

KAUSHIK, S. N. SCOFFIELD, J. ANDUKURI, A. ALEXANDER, G. C. WALKER, T. KIM, S. CHEON, K. Evaluation of ciprofloxacin and metronidazole encapsulated biomimetic nanomatrix gel on *Enterococcus faecalis* and *Treponema denticola*. **Biomat res**. v. 19. n. 9, 2015. Doi:10.1186/s40824-015-0032-4.

KHAN, I. ABBAS, T. ANJUM, K. ABBAS, S. Q, SHAGUFTA, B.I. SHAH, S. A. A. AKHTER, N. HASSAN, S. S. Antimicrobial potential of aqueous extract of *Camellia sinensis* against representative microbes. **Pak J Pharma Sci**, v. 32.n. 2. p. 631-636, 2019.

KIERZKOWSKA, M. PEDZISZ, P. BABIAK, I. JANOWICZ, J. KULIG, M. MAJEWSKA, A. et al. Orthopedic infections caused by obligatory anaerobic gram-negative rods: report of two cases. **Med Microbiol Immunol**, v. 206. p. 363–366, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0513-2>.

KISTLER, J. O. BOOTH, V. BRADSHAW, D.J. WADE, W.G. Bacterial community development in experimental gingivitis. **Plos One**. v. 8. e 71227, 2013.

KOCHAN, T.J. SOMERS, M.J. KAISER, A. M. et al. Intestinal calcium and bile salts facilitate germination of *Clostridium difficile* spores. **Plos Pathog**, v. 13. e1006443, 2017.

KUSHKEVYCH, I.V. Activity and kinetic properties of phosphotransacetylase from intestinal sulfate-reducing bacteria. **Acta Biochem.** Pol. V. 62. P. 1037–1108, 2015.

KUSHKEVYCH, I. KOVÁČ, J. VÍTEZOVÁ, M. VÍTEZ, T. BARTOS, M. The diversity of sulfate-reducing bacteria in the seven bioreactors. **Arch. Microbiol.** v. 200. p. 945–950, 2018.

KUSHKEVYCH, I. DORDEVIC, D. VÍTEZOVÁ, M. Toxicity of hydrogen sulfide toward sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio piger* Vib-7. **Arch. Microbiol.** v. 201. p. 389–397, 2019.

LANGENDIJK-GENEVAUX, P.S. HANSEN, J.T.J. VAN DER HOEVEN, J.S. Decrease of Sulfate-Reducing Bacteria after Initial Periodontal Treatment. **J. Dent. Res.** V. 80. p. 1637–1642, 2001.

LANGENDIJK, P.S. KULIK, E.M. SANDMEIER, H. MEYER, J. VAN DER HOEVEN, J. S. Isolation of *Desulfomicrobium orale* sp. Nov. and *Desulfovibrio* Strain NY682, Oral Sulfate-Reducing Bacteria Involved in Human Periodontal Disease. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 51. P. 1035–1044, 2001.

LAWSON, P. A. CITRON, D. M, TYRRELL, K.L, FINEGOLD, S. M. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Preevot 1938. **Anaerobe.** v. 40. p. 95–99, 2016.

LEE, E.M. BAI, H. W, LEE, S.S. HONG, S.H. CHO, J.Y. CHUNG, B.Y. Gamma irradiation improves the antioxidant activity of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis miller*) extracts. **Rad Physics Chem**, v. 81, n.5 p. 1029-1032, 2012.

LEFFLER, D.A, LAMONT, J.T. *Clostridium difficile* infection. **N Engl J Med.** v. 373. p. 287–288, 2015.

LIMA, T. B. F. EURIDES, D. REZENDE, R. J. MILKEN, V.M. F. SILVA, L. A. F, FIORAVANTI, M. C. S. Escova dental e dedeira na remoção da placa bacteriana dental em cães. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 155-158, 2004.

LIU, L. LI, Y. LI, S. HU, N. HE, Y. PONG, R. LIN, D. LU, L. LAW, M. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. **J Biomed and Biotech**, v. 01, p. 1-11, 2012.

LOOZEN, G. OZCELIK, O. BOON, N. DE MOL, A. SCHOEN, C. QUIRYNEN, M. TEUGHELIS, W. Inter-bacterial correlations in subgingival biofilms: a large-scale survey. **J Clin Periodontol**, v. 41. p. 1–10, 2014.

LINDINGER. M. I. Reduced Dental Plaque Formation in Dogs Drinking a Solution Containing Natural Antimicrobial Herbal Enzymes and Organic Matcha Green Tea. **Scientifica**. 2016. Doi: <https://doi.org/10.1155/2016/2183623>.

LUNDBERG, D. YOURSTONE, S. MIECZKOWSKI, P. JONES, C.D. DANGL, J.L. Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. **Methods**, v. 10. n. 4. p. 999–1002. 2013. Doi: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2634>.

MAJEWSKA, A. KIERZKOWSKA, M. KAWECKI, D. What we actually know about the pathogenicity of *Bacteroides pyogenes*. *Medical Microbiology and Immunology*. v. 210. p. 157–163, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00430-021-00709-2>.

MARSHALL, M. D. WALLIS, C. V. MILELLA, L. COLYER, A. TWEEDIE, A.D. HARRIS, S. A longitudinal assessment of periodontal disease in 52 miniature schnauzers. **BMC Vet. Res.** v. 10 n. 166. p. 1-13, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-166>.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMB net.journal**, v. 17 n. 1. p. 10-12. 2011. Doi:<https://doi.org/10.14>.

MARTINS, L.F. ANTUNES, L.P. PASCON, R.C. OLIVEIRA, J.C.F. DIGIAMPIETRI, L.A. et al. Metagenomic analysis of a tropical composting operation at the são paulo zoo park reveals diversity of biomass degradation functions and organisms. **Plos One**, v. 8, n. 4, p. e61928, 2013.

MCDONALD, J.E. LARSEN, N. PENNINGTON, A. CONNOLLY, J. WALLIS, C. ROOKS, D. J. HALL, N. MCCARTHY, A. J. ALLISON, H. E. Characterising the Canine Oral Microbiome by Direct Sequencing of Reverse-Transcribed rRNA Molecules. **Plos One**, v. 11. n. 6. p. 1-17, 2016. Doi:10.1371/journal.pone.0157046.

MENEGHINE, A. K. SILVA, D.B. MILLAN, R.N. SIPAUBA-TAVARES, L.H. LEMOS, E.G.M. ALVES, L.M.C. Bacterial community in two subtropical fishponds in São Paulo, Brazil. **Afr J Microbiol Res**, v. 9, n. 7, p. 404–413, 2015.

METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature Rev**, v. 11, p. 31-46, 2010.

MOHANTY, R. ASOPA, S. J. JOSEPH, M. D. SINGH, B. RAJGURU, J. P. SAIDATH, K. SHARMA, U. Red complex: Polymicrobial conglomerate in oral flora: A review. **J fam med prim care**, v. 8.n 11. p. 3480–3486, 2019. Doi: 10.4103/jfmpe.jfmpe\_759\_19.

MURAMATSU, Y. HARAYA, N. HORIE, K. UCHIDA, L. KOORIYAMA, T. SUZUKI, A. HORIUCHI, M. *Bergeyella zoohelcum* isolated from oral cavities of therapy dogs. **Zoon Public Health**, n. 1. v 2. p: 1–7, 2019.

NAGAO, Y.; TANIGAWA, T. Red complex periodontal pathogens are risk factors for liver cirrhosis. **Biomed rep**, v. 11. n. 5. p. 199–206, 2019. Doi: 10.3892/br.2019.1245.

NAGY, E. BOYANOVA, L. JUSTESEN, U.S. How to isolate, identify and determine antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in routine laboratories. **Clin Microbiol Infect**, v. 24. p.1139–1148, 2018. Doi: [https://doi.org/ 10.1016/j.cmi.2018.02.008](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.02.008).

OBA, P. M. CARROLL, M.Q. ALEXANDER, C. et al. Microbiota populations in supragingival plaque, subgingival plaque and saliva habitats of adult dogs. **Microbiome animal**, v. 3. n. 38. p. 1-18. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00100-9>

O'BRIEN, S. L. GIBBONS, S.M. OWENS, S.M. HAMPTON-MARCELL, J. JOHNSTON, E.R. JASTROW, J.D. et al. Spatial scale drives patterns in soil bacterial diversity. **Environ. Microbiol**, v. 18. p. 2039–2051, 2016.

OEHLER, R.L. VELEZ, A.P. MIZRACHI, M. LAMARCHE, J. GOMPF, S. Bite-related and septic syndromes caused by cats and dogs. **Lancet Infect Dis** v. 9. n. 7 p. 439–447, 2009.

ONDOV, B.D, BERGMAN, N. H, PHILLIPPY, A.M. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. **BMC Bioinformatics**, v. 12. n. 1. p. 385, 2011.

OREN, A. GARRITY, G. M. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 67. P. 3140–3143, 2017.

OVESEN, A.L. RIIHIMÄKI, M. BÅVERUD, V. PRINGLE, M. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides* spp. from clinical samples from horses. **J Equine Vet Sci**. v. 45. p. 46–52, 2016.

PARK, S.R. KIM, D.J. HAN, S.H. KANG, M.J. LEE, J.Y. JEONG, Y.J. LEE, S.J. et al. Diverse Toll-like receptors mediate cytokine production by *Fusobacterium nucleatum* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in macrophages. **Infect Immun**. V. 82. P. 1914–1920, 2014.

PAVLICA, Z. PETELIN, M. JUNTES, P. ERZEN, D. CROSSLEY, D. A. SKALERIC, U. Periodontal Disease Burden and Pathological Changes in Organs of Dogs. **J Vet Dent**, v. 25. n. 2. p. 97-105, 2008.

PENG, Z. LIANG, W. WANG, F. XU, Z. XIE, Z. LIAN, Z. HUA, L. ZHOU, R. CHEN, H. WU, B. Genetic and phylogenetic characteristics of *Pasteurella multocida* isolates from different host species. **Front Microbiol**, v. 9. p. 1408, 2018. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01408>.

PEREIRA DOS SANTOS, J.D. CUNHA, E. NUNES, T. TAVARES, L. OLIVEIRA, M. Relation between periodontal disease and systemic diseases in dogs. **Res Vet Sci**, v. 125 p. 136–140, 2019.

PINTO, A. B. F. SAAD, F. M. O. B. LEITE, C. A. L. AQUINO, A. A. ALVES, M. P. PEREIRA, D. A. R. Tripolifosfato de sódio e hexametáfosfato de sódio na prevenção do cálculo dentário em cães. **Arq Bras Med Vet e Zootec**, v. 60, n. 6, p. 1426-1431, 2008.

PINTO, B. A. M. COSTA, A.F.N. YOULE, C.C. FILHO, M.S. CARVALHO, E.B. Principais características demográficas e nosológicas das doenças da cavidade oral de cães atendidos em um serviço de odontologia veterinária. **R bras Ci Vet**, v. 27, n. 4, p.188-192, 2020.

RADEEROM, T. THONGKORN, K. BUDDHACHAT, K. PRADIT, W. CHOMDEJ, S. SIENGDEE, P. NGANVONGPANIT, K. Investigation of the calculus microbiome in canines and felines using next-generation sequencing. **Kafkas Univ Vet Fak Derg**, v. 24 n. 4.p. 589-598, 2018. Doi: 10.9775/kvfd.2018.19690

RAMOS, A.S. BOTTEON, R.C.C.M. ANTUNES, M.S. VEIGA, C.C.P. OLIVEIRA, A. Bacteremia transitória em cães com doença periodontal em diferentes procedimentos odontológicos e usuais. **J Bras Vet Med**, v. 33. n. 2. p. 73-78, 2011.

RIEP, B. EDESI-NEUSS, L. CLAESSEN, F. SKARABIS, H. EHMKE, B. FLEMMIG, T.F. et al. Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? **J Clin Microbiol.**; v. 47. p. 1705–1711, 2009.

RIGGIO, M. P. LENNON, A. TAYLOR, D. J. BENNETT, D. Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. **Vet Microbiol**, v. 150 n. 3. p.394-400. 2011. Doi: 10.1016/j.vetmic.2011.03.001

ROCHA, S. A. CASTRO, S. V. Prevalência de placa bacteriana em cães submetidos à alimentação sólida e/ou macia. **Rev cient med vet**, v. 10 n. 30.p. 1-11, 2018.

RODRIGUES, J. F. M. SCHMIDT, T. S. B. TACKMANN, J. MERING, C. V. MAPseq: highly efficient k-mer search with confidence estimates, for rRNA sequence analysis. **Bioinformatics**, v. 33, n. 23. p.3808–3810. 2017. Doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx517>

ROJAS, C. F. C., GANOZA, L. A. C. La actividad antibacteriana de *Camellia sinensis* comparada con propóleo frente al *Streptococcus mutans*. **Rev Cubana Estomatol**, v. 57. n. 1, 2020. Disponível em: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S003475072020000100009&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475072020000100009&lng=es&nrm=iso)>. Acesso em: 02 de julho de 2021.

RUPARELL, A. WALLIS, C. HAYDOCK, R. CAWTHROW, A. HOLCOMBE, L.J. Comparison of subgingival and gingival margin plaque microbiota from dogs with healthy gingiva and early periodontal disease. **Res Vet Sci**. v. 136. p. 396-407, 2021.

SANTANA, J.O. GRAMACHO, K.P. FERREIRA, K.T.S.E. et al. Witches' broom resistant genotype CCN51 shows greater diversity of symbiont bacteria in its phylloplane than susceptible genotype catongo. **BMC Microbiol** v. 18 n. 194. 2018. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1339-9>.

SANTOS, N. S.; CARLOS, R. S. A.; ALBUQUERQUE, G. R. Doença periodontal em cães e gatos. **Revista Científica Medvop**, v. 10, n. 32, p. 30-41. 2012.

SAPHIR, D. A. CARTER, G. R. Gingival flora of the dog with special reference to bacteria associated with bites. **J Clin Microbiol**, v. 3. p. 344–349, 1976. Disponível em:



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC274297/>. Acesso em: setembro de 2021.

SEMEDO-LEMSADDEK, T. TAVARES, M. SÃO BRAZ, B. TAVARES, L. OLIVEIRA, M. Enterococcal Infective Endocarditis following Periodontal Disease in Dogs. **Plos One**, v. 11, n. 1, p. 1-6. 2016.

SHUKLA, S. K. PAUSTIAN, D. L. STOCKWELL, P. J. MOREY, R. E. JORDAN, J. G. LEVETT, P. N. FRANK, D. N. REED, K. D. Isolation of a fastidious *Bergeyella* species associated with cellulitis after a cat bite and a phylogenetic comparison with *Bergeyella zoohelcum* strains. **J Clin Microbiol**, v. 42. p. 290–293, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.290-293>. 2004.

SILVA, A. F. DA SILVA, E.T.C. COSTA, S.R.R. BEZERRA, P.L. LOURENÇO, A.H.A. BERNARDINO, I.M. O uso do Aloe vera como coadjuvante no tratamento periodontal. **Res Soc Dev**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2021. Doi: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i1.11511>.

SMITS, W.K, LYRAS, D. LACY, D.B. et al. *Clostridium difficile* infection. **Nat Rev Dis Primers**. V. 2. P. 16 - 20, 2016.

STELLA, J. L.; BAUER, A. E.; CRONEY, C. C. A cross-sectional study to estimate prevalence of periodontal disease in a population of dogs (*Canis familiaris*) in commercial breeding facilities in Indiana and Illinois. **Plos One**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2018.

STRAUSS, J. KAPLAN, G.G. BECK, P.L. RIOUX, K. PANACCIONE, R. DEVINNEY, R. LYNCH, T. ALLEN-VERCOE, E. Invasive potential of gut mucosa-derived *fusobacterium nucleatum* positively correlates with IBD status of the host. **Inflamm Bowel Dis**, v. 17. p. 1971–1978, 2011.

STURGEON, A. STULL, J. W. COSTA, M. C. J. WEESE, S. Metagenomic analysis of the canine oral cavity as revealed by high-throughput pyrosequencing of the 16S rRNA

gene. **Vet Microbiol**, V. 162. p. 891–898, 2013. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.018>.

SUZUKI, M. KIMURA, M. IMAOKA, K. YAMADA, A. Prevalence of *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* in dogs and cats determined by using a newly established species-specific PCR. **Vet Microbiol** v. 144. N. 1–2. p. 172–176, 2010.

THEVENIEAU, F. FARDEAU, M.L. OLLIVIER, B. JOULIAN, C. BAENA, S. *Desulfomicrobium thermophilum* sp. Nov., a Novel Thermophilic Sulphate-Reducing Bacterium Isolated from a Terrestrial Hot Spring in Colombia. **Extremophiles**. v. 11. p. 295–303, 2007.

TOWNSEND, K. M. BOYCE, J. D. CHUNG, J. Y. FROST, A. J. ADLER, B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. **J. Clin. Microbiol.** v. 39. P .924–929, 2001. DOI: 10.1128/JCM.39.3.924-929, 2001.

TROPICLEAN, 2010. Wentzville, MO, USA. Disponível em: <https://tropiclean.com/product/fresh-breath-by-tropiclean-oral-care-gel-for-dogs/>. Acesso em: 03 agosto, 2021.

TURCATTI, G. ROMIEU, A. FEDURCO, M. TAIRI, A.P. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. **Nucl Acid Res**, v. 36, n. 4, p. 1-13, 2008.

VOHA, C. DOCQUIER, J.D. ROSSOLINI, G.M. FOSSE, T. Genetic and biochemical characterization of FUS-1 (OXA-85), a narrow-spectrum class D beta-lactamase from *Fusobacterium nucleatum* subsp. polymorphum. **Antimicrob Agents Chem**, v.50. n. 8. p. 2673-2679, 2006. Doi: 10.1128/AAC.00058-06.

WALLIS, C. MARSHALL, M. COLYER, A. O'FLYNN, C. DEUSCH, O. HARRIS S. A longitudinal assessment of changes in bacterial community composition associated

with the development of periodontal disease in dogs. **Vet Microbiol**, v. 181. p. 271-282, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.09.003>

WALLIS, C. HOLCOMBE, L. J. A review of the frequency and impact of periodontal disease in dogs. **J Small Anim Pract**, v. 61. p. 529–540, 2020. Doi: 10.1111/jsap.13218

WALLIS, C. SAITO, E.K. SALT, C. HOLCOMBE, L.J. DESFORGES, N.G. Association of periodontal disease with breed size, breed, weight, and age in pure-bred client-owned dogs in the United States. **The Veterinary Journal**, v. 17. n. 7 p. 1-9, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2021.105717>.

WILKIE, I.W. HARPER, M. BOYCE, J.D. ADLER, B. *Pasteurella multocida*: diseases and pathogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol**. v. 361. p. 1–22, 2012.

WILSON, B.A. HO, M. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology. **Clin Microbiol Rev**. v. 26. p. 631– 655, 2013.

XU, P.; GUNSOLLEY, J. Application of metagenomics in understanding oral health and disease. **Virulence**, v. 5. n. 3. p. 424-432, 2014. DOI: 10.4161/viru.28532.

YANG, N.Y. ZHANG, Q. LI, J.L. YANG, S.H. SHI, Q. Progression of periodontal inflammation in adolescents is associated with increased number of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, and *Fusobacterium nucleatum*. **Int J Paediatr Dent**. v. 24. p. 226–233, 2014.

YODA, Y. HU, Z. Q. ZHAO, W. H. SHIMAMURA, T. Different susceptibilities of *Staphylococcus* and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate. **J. Infect. Chemother**, v. 10.n. 1. p. 55-58, 2015.

YOSHIMURA, F. MURAKAMI, Y. NISHIKAWA, K. HASEGAWA, Y. KAWAMINAMI, S. Surface components of *Porphyromonas gingivalis*. **J Period Res**. v. 44, n. 1, p. 1–12, 2009.

ZANATTA, F. B. ANTONIAZZI, R. P. RÖSING, C. K. The Effect of 0.12% Chlorhexidine Gluconate Rinsing on Previously Plaque-Free and Plaque-Covered Surfaces: A Randomized, Controlled Clinical Trial. **J periodont**, v. 78, n.11, p. 2127 - 2134, 2007.

ZANGENAH, S. BERGMAN, P. Rapid killing of *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* by human whole blood and serum is mediated via the complement system. **Springerplus**, v. 17. n. 4 p. 517-526, 2015. Doi: 10.1186/s40064-015-1308-9.

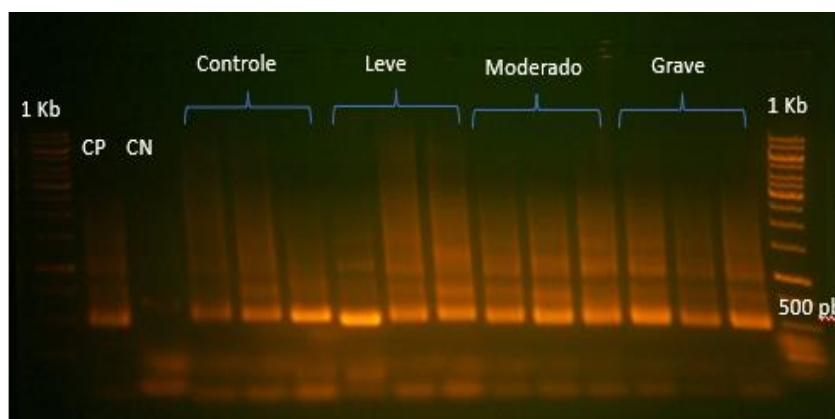
## ANEXOS

### ANEXO I: Protocolo de Extração de DNA utilizando o kit PowerSoil:

1. To the PowerBead Tubes provided, add 0.25 grams of soil sample.
2. Gently vortex to mix.
3. Check Solution C1. If Solution C1 is precipitated, heat solution to 60°C until dissolved before use.
4. Add 60 µl of Solution C1 and invert several times or vortex briefly.
5. Secure PowerBead Tubes horizontally using the MO BIO Vortex Adapter tube holder for the vortex (MO BIO Catalog# 13000-V1-24) or secure tubes horizontally on a flat-bed vortex pad with tape. Vortex at maximum speed for 10 minutes.
6. Make sure the PowerBead Tubes rotate freely in your centrifuge without rubbing. Centrifuge tubes at 10,000 x g for 30 seconds at room temperature. CAUTION: Be sure not to exceed 10,000 x g or tubes may break.
7. Transfer the supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided). If you are using the 24 place Vortex Adapter for more than 12 preps, increase the vortex time by 5-10 minutes.
8. Add 250 µl of Solution C2 and vortex for 5 seconds. Incubate at 4°C for 5 minutes.
9. Centrifuge the tubes at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.
10. Avoiding the pellet, transfer up to, but no more than, 600 µl of supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).
11. Add 200 µl of Solution C3 and vortex briefly. Incubate at 4°C for 5 minutes.
12. Centrifuge the tubes at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.
13. Avoiding the pellet, transfer up to, but no more than, 750 µl of supernatant into a clean 2 ml Collection Tube (provided).
14. Shake to mix Solution C4 before use. Add 1200 µl of Solution C4 to the supernatant and vortex for 5 seconds.
15. Load approximately 675 µl onto a Spin Filter and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature. Discard the flow through and add an additional 675 µl of supernatant to the Spin Filter and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature. Load the remaining supernatant onto the Spin Filter and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature.

16. Add 500 µl of Solution C5 and centrifuge at room temperature for 30 seconds at 10,000 x g.
17. Discard the flow through.
18. Centrifuge again at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.
19. Carefully place spin filter in a clean 2 ml Collection Tube (provided). Avoid splashing any Solution C5 onto the Spin Filter.
20. Add 100 µl of Solution C6 to the center of the white filter membrane. Alternatively, sterile DNA-Free PCR Grade Water may be used for elution from the silica Spin Filter membrane at this step (MO BIO Catalog# 17000-10).
21. Centrifuge at room temperature for 30 seconds at 10,000 x g.
22. Discard the Spin Filter. The DNA in the tube is now ready for any downstream application. No further steps are required.

**ANEXO II:** Gel de agarose evidenciando as amostras positivas. 1Kb é o marcador utilizado; CP: Controle positivo; CN: Controle negativo.



**ANEXO III:** Valores do teste de qui quadrado ( $X^2$ ) e de p da comparação entre as espécies dos gêneros *Prophyromonas*, *Bacteroides*, *Moraxella* e *Treponema*, nos diferentes estágios de infecção (controle, leve, moderado e grave) e nos diferentes períodos de avaliação.

Grupos	Pares de análises	<i>Porphyromonas</i>		<i>Bacteroides</i>		<i>Moraxella</i>		<i>Treponema</i>	
		X2	p value	X2	p value	X2	p value	X2	p value
controle	ST - G1	12.035	<b>0.007</b>						
	ST - G2	4.8024	0.272						
Leve	ST - G1	0.58583	2.699	1.253	0.789	0.001	2.936	0.914	1.017
	ST - G2	0.59243	2.695	0.152	2.090	0.039	2.532	0.550	1.375
Moderado	ST - G1	2.1359	1.634	0.000	3.000	0.039	2.532	0.902	1.026
	ST - G2	5.658	0.389	0.798	1.115	2.976	0.254	0.323	1.709
Grave	ST - G1		2.715	0.499	2.337			0.352	2.516
	ST - G2		2.590	7.158	0.084			0.068	2.900
Sem Tratamento	C - L		<b>0.017</b>						
	C - M		0.200						
	C - G	3.1402	1.248						
	L - M	5.1434	0.970	0.113	2.211	1.250	0.264	<b>0.004</b>	2.847
	L - G	1.0972	4.667	33.129	<b>0.000</b>			<b>0.013</b>	2.724
	M - G	2.7888	2.552	0.026	2.615			<b>0.000</b>	3.000

Legenda. Períodos de avaliação: ST) sem tratamento, G1) 1º mês de tratamento, G2) 2º mês de tratamento; Estágios de infecção: C) Controle, L) leve, M) moderado, e G) grave. Para as análises em que houve valor de p e não tem o resultado do qui quadrado é porque foi realizado o teste de Fisher.