

**KAMILA SOARES COELHO**

**COMPOSTOS SULFURADOS VOLÁTEIS E CÁLCIO IONIZADO SÉRICO E  
SUA RELAÇÃO COM A SAÚDE ORAL DE CÃES**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária, para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

C672c  
2019 Coelho, Kamila Soares, 1991-  
Compostos sulfurados voláteis e cálcio ionizado sérico e sua relação com a saúde oral de cães / Kamila Soares Coelho. – Viçosa, MG, 2019.  
iv, 15f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Fabricio Luciani Valente.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.12-15.

1. Odontologia veterinária. 2. Halitose. 3. Microbiota.  
4. Saúde bucal. 5. Boca - Fisiologia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22 ed. 636.708976

KAMILA SOARES COELHO

**COMPOSTOS SULFURADOS VOLÁTEIS E CÁLCIO IONIZADO SÉRICO E SUA  
RELAÇÃO COM A SAÚDE ORAL DE CÃES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de fevereiro de 2019.

  
Emilly Correna Carlo Reis

  
Gabriel Domingos Carvalho

  
Fabricio Luciani Valente  
(Orientador)

## SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT .....	iv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
2.1. Placa dental .....	2
2.2. Bactérias orais de cães.....	3
2.3. Halitose.....	3
2.4. Patogenia da doença periodontal .....	4
2.5. Relação do cálcio ionizado com a doença periodontal .....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	5
3.1. Aspectos éticos.....	5
3.2. Seleção dos animais.....	6
3.3. Quantificação do cálcio ionizado sérico .....	6
3.4. Quantificação dos compostos sulfurados voláteis (CSVs).....	6
3.5. Avaliação da formação da placa dental .....	6
3.6. Isolamento e identificação da microbiota oral .....	7
3.7. Isolamento de bactérias ácido lácticas .....	7
3.8. Análise dos dados .....	8
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	8
5. CONCLUSÃO.....	11
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	12

## RESUMO

COELHO, Kamila Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Compostos sulfurados voláteis e cálcio ionizado sérico e sua relação com a saúde oral de cães.** Orientador: Fabrício Luciani Valente.

Na odontologia veterinária a doença periodontal acomete a maioria dos cães adultos e um sinal clínico característico é o mau hálito, que é resultado da produção de compostos sulfurados voláteis (CSVs) pelo metabolismo bacteriano. O objetivo deste trabalho foi analisar a existência da quantidade de CSVs e cálcio ionizado sérico com a saúde oral de cães. Para isso, 20 cães adultos foram atendidos na rotina cirúrgica do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa e submetidos à avaliação clínica da cavidade oral. Foram avaliados: produção de CSVs; superfície dentária acometida pela placa dental sendo observada com coloração por solução de fucsina; cálcio ionizado sérico foi mensurado por meio do soro sanguíneo; idade do animal e uma amostra da microbiota oral coletada da cavidade oral com *swab* estéril sendo transferido para meios de cultivo seletivos. Catorze animais apresentaram placa dental e seis apresentaram cálculo dental. A idade mostrou-se inversamente proporcional ao cálcio ionizado sérico, em cães com placa e cálculo dental. A idade dos animais foi diretamente proporcional a bactérias totais em placa e cálculo dental. Bactérias totais foram diretamente proporcionais a bactérias aeróbias em placas dentais. Bactérias totais foram diretamente proporcionais a bactérias anaeróbias em placa e cálculo dental. Os níveis de CSVs foram diretamente proporcionais à porcentagem de cocos aeróbios em placa dental. Foram observadas bactérias ácido lácticas gram positiva e catalase negativa em somente quatro animais (0,14% das bactérias totais). A fisiologia oral é influenciada pela microbiota oral, de forma que mensurar os CSVs pode ajudar na avaliação precoce da doença periodontal em cães e o cálcio ionizado sérico parece não ter relação com a microbiota oral. Com relação a idade dos animais, cães mais velhos tendem a ter maior quantidade de bactérias totais em relação a animais jovens. De forma que, as bactérias aeróbias são as primeiras colônias a se fixarem nos dentes, formando a placa dental e as bactérias anaeróbias estão em maior quantidade em animais com cálculo dental. Logo cães tem uma microbiota oral mista.

## ABSTRACT

COELHO, Kamila Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Volatile sulfur compounds and serum ionized calcium and its relationship with oral health of dogs.** Adviser: Fabrício Luciani Valente.

In veterinary dentistry, periodontal disease affects most adult dogs and a characteristic clinical sign is bad breath, which results from the production of volatile sulfur compounds (VSCs) by bacterial metabolism. The objective of this work was to analyze the existence of the amount of VSCs and serum ionized calcium with oral health of dogs. For this, 20 adult dogs were treated in the surgical routine of the Veterinary Hospital of the Federal University of Viçosa and submitted to clinical evaluation of the oral cavity. The following were evaluated: VSCs production; dental surface affected by dental plaque being observed with fucsin solution staining; serum ionized calcium was measured by means of blood serum; age of the animal and a sample of the oral microbiota collected from the oral cavity with sterile swab being transferred to selective culture media. Fourteen animals presented dental plaque and six presented dental calculus. Age was inversely proportional to serum ionized calcium in dogs with plaque and dental calculus. Age of the animals was directly proportional to total plaque bacteria and dental calculus. Total bacteria were directly proportional to aerobic bacteria on dental plaques. Total bacteria were directly proportional to plaque anaerobic bacteria and dental calculus. VSCs levels were directly proportional to the percentage of aerobic cocci in dental plaques. Gram positive bacteria and catalase negative bacteria were observed in only four animals (0.14% of total bacteria). Oral physiology is influenced by the oral microbiota, so measuring CSVs may help in the early assessment of periodontal disease in dogs and serum ionized calcium seems to be unrelated to the oral microbiota. Regarding the age of the animals, older dogs tend to have larger amounts of total bacteria compared to young animals. Thus, aerobic bacteria are the first colonies to be fixed to the teeth, forming the dental plaque and the anaerobic bacteria are in greater quantity in animals with dental calculus. Soon dogs have a mixed oral microbiota.

## 1. INTRODUÇÃO

Na odontologia veterinária a doença que mais acomete cães adultos é a doença periodontal. Estudos realizados no Brasil constataram prevalências entre 71,4% e 92,5% (Milken et al.; 2003; Venturini et al., 2007; Fernandes et al.; 2012). A doença periodontal é uma doença com caráter inflamatório, que compromete a gengiva, o tecido conjuntivo de suporte do dente e o osso alveolar (Pihlstrom et al., 2005). Consequências importantes são: perda dentária, fístula oronasal e fratura patológica na mandíbula; entretanto, o envolvimento da doença periodontal com enfermidades sistêmicas deve ser considerado, como endocardite, redução da função dos rins e fígado e inflamação sistêmica promovendo doenças crônicas e alteração do sistema imune (Niemiec, 2008).

A doença inicia-se com a formação de placa dental, composta por uma camada de glicoproteínas presentes fisiologicamente no fluido oral que atua como um meio para a formação do biofilme, que poderá mineralizar, formando o cálculo dentário. A doença progride para gengivite, seguindo para periodontite (Harvey, 2005).

O tratamento periodontal ideal é o profilático, que consiste na remoção da causa, através da limpeza dentária, extração da placa e do cálculo dental, polimento dos dentes, além de cuidados domiciliares diários. Se necessário, o acesso cirúrgico para a redução da bolsa periodontal profunda por meio de um retalho na gengiva ou gengivoplastia e extração dentária (Harvey, 2005). Porém, o periodonto não se regenera e rapidamente este local será preenchido por tecido conjuntivo e epitelial, com mínima formação do tecido ósseo, perdido pela doença periodontal (Carlo Reis et al., 2011).

Na microbiota oral, foram identificados mais de 37 gêneros de bactérias diferentes, dentre os quais destacam-se *Actinomyces*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Granulicatella*, *Neisseria* e *Porphyromonas* (Elliott et al., 2005). Muitas dessas bactérias produzem compostos sulfurados voláteis (CSVs) que causam o mau hálito e podem contribuir com a destruição de componentes do periodonto (Szabo, 2018). Inflamação e reabsorção óssea ocorrem pela interação entre infecção microbiana e resposta do hospedeiro, as bactérias estimulam uma resposta inflamatória liberando citocinas, quimiocinas, leucotrienos e prostaglandinas para a área afetada

estimulando a destruição de componentes do periodonto e reduzindo a formação de osteoclastos (Graves et al., 2011).

Os CSVs podem ser mensurados de uma maneira simples a partir do hálito do paciente, refletindo a proliferação bacteriana na cavidade oral, podendo auxiliar no diagnóstico precoce da doença periodontal. Assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar a existência da quantidade de CSVs e cálcio ionizado sérico com a saúde oral de cães.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Placa dental

O microambiente da cavidade oral é favorável para o crescimento de microrganismos, pois é um local sempre úmido, quente e rico em nutrientes. O fluido oral, ao evaporar, forma uma camada de glicoproteínas, geralmente nas coroas dos dentes. Assim, o biofilme encontra uma excelente condição para se estabelecer e, ao se fixar nos dentes, é chamado de placa dental. A formação da placa dental dá-se pela colonização inicial por cocos aeróbios. Com a proliferação do biofilme, há então um crescimento de outras bactérias aeróbias ou facultativas, formando um ambiente com pouca oxigenação, o que possibilita a agregação de bactérias anaeróbias. Este processo, em cães, transcorre em aproximadamente 24 horas (Harvey, 2005).

Basicamente, o biofilme é uma camada fina, constituída por um material vivo, capaz de se fixar em diferentes tipos de superfícies e ambientes. Pode-se agregar a uma única célula ou em várias, além de bactérias, juntamente com matriz extracelular (Karatan e Watnick, 2009). As bactérias têm a propensão de se fixar na cavidade oral por meio da formação de biofilme, geralmente as primeiras espécies bacterianas são dos gêneros *Neisseria* e *Bergeyella* (Holcombe et al., 2014).

No início da formação da placa dental, não é possível identificá-la a olho nu, somente com um corante específico é possível evidenciar a placa, identificando os locais dos dentes afetados (Pieri et al., 2016).

Com o tempo, a placa dental pode sofrer mineralização, formando o cálculo dental. O produto da metabolização das bactérias pode alterar o padrão e a taxa de mineralização da placa. A formação do cálculo dental também pode ter origem não bacteriana (Schroeder e Shanley, 1969). O principal componente do cálculo dental em cães é a hidroxiapatita carbonatada e outros fosfatos de cálcio, entretanto são influenciados pelos componentes inorgânicos da saliva (Borah et al., 2014).

## 2.2. Bactérias orais de cães

Na boca saudável de um cão, geralmente estão presentes as espécies de bactérias *Moraxella* sp., *Bergeyella zoohelcum*, *Neisseria shayeganii*, *Pasteurellaceae* sp. *Capnocytophaga* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Porodromonas cangingivalis* e *Capnocytophaga cynodegmi*, podendo alterar a prevalência em casos de gengivite ou periodontite. Porém, em processos patológicos orais, são mais comuns as espécies *Peptostreptococcaceae* sp., *Lachnospiraceae* sp., *Clostridiales* sp., *Peptococcus* sp. e *Corynebacterium canis*. Animais com a cavidade oral saudável têm menor diversidade e quantidade de bactérias (Davis et al., 2013).

As bactérias ácido lácticas (BALs) estão presentes na cavidade oral (Badet e Thebaud, 2008) e podem interagir com a microbiota oral e reduzir a capacidade de formação de biofilme (Jiang et al., 2016).

## 2.3. Halitose

A halitose é caracterizada por um odor desagradável proveniente da cavidade bucal que pode ser gerado por bactérias produtoras de CSVs sendo que o aumento deste está relacionado com a quantidade de bactérias patogênicas. O aumento de CSVs segue gradativamente com aumento do grau da doença periodontal (Nordhoff et al., 2008).

Kang et al. (2017) identificou em seu estudo *in vitro*, cinco cepas bacterianas produtoras de CSVs: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* produziu  $\text{CH}_3\text{SH}$  e  $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ , *Fusobacterium nucleatum* produziu  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{CH}_3\text{SH}$  e  $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ , *Porphyromonas gingivalis* produziu  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{CH}_3\text{SH}$  e  $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ , *Treponema denticola* produziu  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{CH}_3\text{SH}$  e  $(\text{CH}_3)_2\text{S}$  e *Tannerella forsythia* produziu  $\text{CH}_3\text{SH}$ .

A mensuração dos CSVs pode ser realizada pelo método subjetivo, por meio organoléptico ou pelo método clínico por meio do equipamento Halimeter® (Nordhoff et al., 2008). O Halimeter® mensura a concentração de CSVs de forma confiável por método quantitativo, possibilitando acompanhar o progresso do tratamento através da mensuração da halitose (Halimeter®, Interscan RH-17K, USA). É um método para constatar a halitose, podendo-se associar a halitose com o grau da doença periodontal (Rawlings e Culham, 1998).

#### **2.4. Patogenia da doença periodontal**

Em resposta à presença crônica de bactérias na placa dental, desenvolve-se uma resposta inflamatória nos tecidos adjacentes, denominada gengivite e periodontite. Como consequência tem a danificação de estruturas do periodonto, principalmente por enzimas proteolíticas e liberação de fatores quimiotáticos em consequência da resposta imune inflamatória (Pihlstrom et al., 2005).

A gengivite pode ser reversível, uma vez que ao remover a placa dental, acaba-se com o processo inflamatório. Nem sempre a gengivite progride para periodontite, entretanto, pode gerar problemas locais ou sistêmicos como, gengivite ulcerativa necrosante aguda, estomatite ulcerativa ou estresse severo. Má oclusão dentária e persistência de dentes decíduos proporcionam uma área para maior acúmulo de alimentos, bactérias e pode causar um contato anormal nos dentes, favorecendo a periodontite (Harvey, 1998).

Para um melhor diagnóstico, os dentes devem ser avaliados individualmente. O animal pode estar clinicamente normal, com gengivite; periodontite inicial; periodontite moderada ou periodontite avançada concomitantemente, em diferentes elementos dentários (AVDC, 2017).

A periodontite acomete inicialmente o sulco gengival, por onde chega ao periodonto de suporte: cemento, ligamento periodontal e osso alveolar. Com destruição do tecido de fixação periodontal, pode ter exposição da raiz dental, variável profundidade da bolsa periodontal (Harvey, 1998), perda permanente das estruturas do periodonto e perda do dente (Pihlstrom et al., 2005).

## **2.5. Relação do cálcio ionizado com a doença periodontal**

De todo cálcio sérico presente no organismo, cerca de 45% a 50% está na forma ionizada, sendo a forma biologicamente ativa do cálcio e sua homeostase é fundamental (Andriolo et al., 2004). O cálcio ionizado regula a secreção de paratormônio e calcitonina, além de regular diretamente sua própria taxa de reabsorção, pequenos desvios da concentração de cálcio ionizado sérico fornecem pistas para diagnosticar possíveis doenças (Schenck et al., 2006).

Em inflamações orais, a formação óssea é interrompida além de ter interação com os leucócitos das respostas imunes: inata e adaptativa e estimular a reabsorção óssea (Graves et al., 2011).

Carreira et al. (2015) relataram que a mensuração dos níveis séricos de cálcio ionizado pode ser um bom método de diagnóstico da doença periodontal, podendo-se inclusive estabelecer e monitorar o grau da doença periodontal.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. Aspectos éticos**

Este estudo foi realizado em estrita conformidade com as recomendações da Legislação Brasileira, as resoluções normativas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA/MCTI) através da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV) sob protocolo 28/2018. Os protocolos realizados foram supervisionados pelo médico veterinário e coordenador do projeto Fabrício Luciani Valente (CRMV-MG 8090). Os animais utilizados neste trabalho foram atendidos na rotina do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa, após assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido do responsável pelo animal. Os animais foram selecionados na rotina cirúrgica, visto que o exame odontológico completo requer que o animal esteja anestesiado para sua realização minuciosa (Colmery, 2005).

### **3.2. Seleção dos animais**

Foram selecionados para este trabalho, cães adultos, independentemente de raça, sexo e idade, que deram entrada no Setor de Cirurgia do HOV/UFV para realização de cirurgias eletivas.

A avaliação dos animais foi realizada durante um período de seis meses, de fevereiro a julho de 2018, totalizando 20 animais. Foram incluídos apenas os animais que apresentaram a doença periodontal de forma homogênea em todos os dentes. Todos os animais foram avaliados quanto à presença de cálculo dental, cálcio ionizado sérico, concentração de CSVs e porcentagem da superfície dentária acometida pela placa dental.

### **3.3. Quantificação do cálcio ionizado sérico**

Uma amostra de 3 mL de sangue foi coletada em tubo com ativador de coágulo e gel separador, centrifugado e por meio do método de eletrodo seletivo com correção automática para variação do pH foi processada a amostra para quantificação de cálcio ionizado sérico.

### **3.4. Quantificação dos compostos sulfurados voláteis (CSVs)**

Após a indução anestésica, foi realizada a quantificação dos CSVs por meio de um monitor portátil, conforme indicado pelo fabricante (Halimeter®, Interscan RH-17K, USA). Um tubo descartável acoplado ao monitor foi inserido na cavidade oral do paciente e mantido por dez minutos. Foi considerada a média aferida automaticamente pelo equipamento, em partes por bilhão (ppb).

### **3.5. Avaliação da formação da placa dental**

Após a quantificação dos CSVs, foi aplicada sobre os dentes uma solução de fucsina básica a 0,7%, para coloração do biofilme, quando presente. A avaliação da coloração foi feita como descrito por Pieri et al. (2016). As faces vestibulares foram

fotografadas por um smartphone com câmera de 13 megapixels, de forma panorâmica do lado direito ou esquerdo dos animais, a uma distância de cerca de 30 centímetros.

As imagens foram analisadas no programa ImageJ, utilizando a seleção de polígonos para determinar a área geral do dente e a área afetada, nos dentes caninos e primeiro pré-molar de cada animal, calculando a porcentagem da área dental afetada, com valores apresentados entre 0 e 1.

### **3.6. Isolamento e identificação da microbiota oral**

As amostras para isolamento e identificação da microbiota oral foram coletadas com *swab* estéril, por fricção no quarto dente pré-molar superior direito, antes da aplicação da solução de fucsina nos dentes. O *swab* com a amostra foi imerso em tubo com 10 mL de solução salina, submetido à agitação em vórtex a 2200 RPM por dois minutos e diluído em escala decimal até  $10^6$ . Posteriormente, uma alíquota de 0,1 mL de cada amostra foi inoculada, com auxílio de alça de Drigalski, em placa de petri contendo meio de cultura ágar sangue suplementado com 5% de sangue ovino desfibrinado.

As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Foram utilizadas duplicatas em cada diluição, totalizando 240 placas incubadas sob aerobiose e 240 placas incubadas sob anaerobiose. As colônias crescidas foram contadas, transferidas para 3 mL de caldo *brain heart infusion* (BHI) com uma colônia por tubo, incubadas a 37°C por 24 horas e submetidas à análise das características morfotintoriais (Gram e forma) e fisiológicas (catalase).

### **3.7. Isolamento de bactérias ácido lácticas**

Alíquota de 0,1 mL de cada amostra foi inoculada e espalhada com auxílio de alça de Drigalski, na superfície da placa de petri contendo meio de cultura ágar *Mann, Rogosa e Sharpe* (MRS) e incubada a 37 °C por 48 horas sob anaerobiose, foram utilizadas duplicatas de diluições na escala decimal até  $10^6$  totalizando 240 placas. As colônias crescidas foram contadas, transferidas para 3 mL de caldo *brain heart infusion* (BHI) com uma colônia por tubo, incubadas a 37°C por 24 horas e

submetidas à análise das características morfotintoriais (Gram e forma) e fisiológicas (catalase).

### **3.8. Análise dos dados**

Para avaliar se idade, CSVs, cálcio ionizado, bactérias totais e BAL Gram positiva e catalase negativa tem correlação entre animais com placa dental e animais com cálculo dental, foi realizado o teste t de Student ou o teste de Mann-Whitney, conforme o caso. Todas as variáveis foram submetidas ao teste de correlação de Pearson, separadamente para os animais com placa dentária e animais com cálculo dentário. Para todos os testes, foi considerado um nível de significância de 5%.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Dos 20 animais empregados neste estudo, 14 apresentaram placa dental evidenciado com fucsina, sendo que 12 destes animais vieram da rotina eletiva e somente dois da rotina odontológica. Os outros seis cães apresentaram cálculo dental, observado à inspeção visual da boca, sendo dois animais provenientes da rotina eletiva e quatro da rotina odontológica.

A idade média dos animais com cálculo dental foi de  $7,1 \pm 5,3$  anos, variando de 1 a 7 anos, enquanto dos animais com placa dental foi de  $3,5 \pm 2,6$  anos, variando de 1 a 12 anos. Entretanto, não houve diferença estatística entre esses valores ( $p = 0,054$ ). Considerando que em cães, a placa dental é formada ao longo de um dia e logo depois ela pode mineralizar formando o cálculo dental, então animais que não passam por tratamento profilático eventualmente, podem dispor de placa ou cálculo dental em qualquer idade (Harvey, 2005).

Cálcio ionizado sérico não variou de forma significativa entre os dois grupos ( $p = 0,075$ ), tendo os animais com cálculo dental apresentando uma média de  $1,23 \pm 0,073$  mmol/L e os animais com placa dental,  $1,31 \pm 0,08$  mmol/L. A faixa de concentração de cálcio ionizado sérico pode variar entre laboratórios e métodos utilizados. Para cães adultos saudáveis, o valor de referência é de 1,25 a 1,45

mmol/L. Em cães jovens, com até dois anos de idade, os valores podem variar de 0,056 a 0,222 mmol/L acima dos valores apresentados por animais mais velhos (Schenck et al., 2006). No presente trabalho, idade mostrou-se inversamente proporcional ao cálcio ionizado sérico, que variou de 1,13 a 1,42 mmol/L nos cães com placa dental e de 1,13 a 1,31 mmol/L nos animais com cálculo dental. Em ambas as situações, a correlação entre essas variáveis foi fortemente negativa (Tabela 1). Segundo Dias (2012), animais mais velhos e/ou com maior grau de doença periodontal apresentam valores de cálcio ionizado sérico mais baixo, sem definir ao certo se os níveis de cálcio diminuem com o avançar da doença periodontal ou se os estágios da doença aumentam devido à diminuição dos valores de cálcio.

Tabela 1 – Correlação entre idade e cálcio ionizado em cães com placa ou cálculo dentário

Grupo	Placa	Cálculo
Coeficiente de correlação	-0,743	-0,896
Valor de p	0,003	0,039

Teste de correlação de Pearson,  $\alpha = 5\%$ .

A mediana da análise de bactérias totais (aeróbias e anaeróbias) foi de  $5,2 \times 10^5$  UFC/mL nos animais com cálculo dental e de  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL nos animais com placa dental. Entretanto, uma grande variação entre os animais foi observada e, por isso, não houve diferença significativa entre esses valores ( $p = 0,650$ ). Segundo Davis et al. (2013), em animais sem o acometimento evidente da doença periodontal, há maior quantidade de bactérias aeróbias na cavidade oral e, em bocas afetadas, crescem bactérias anaeróbias em sua maioria. No presente trabalho, a idade dos animais foi diretamente proporcional a bactérias totais, animais com cálculo foi fortemente significativa (Tabela 2). Animais mais velhos tem redução da imunidade, favorecendo o acúmulo de bactérias orais (Carreira et al., 2015).

Tabela 2 - Correlação entre idade e bactérias totais em cães com placa ou cálculo dentário

Grupo	Placa	Cálculo
Coeficiente de correlação	0,298	0,913
Valor de p	0,301	0,010

Teste de correlação de Pearson,  $\alpha = 5\%$ .

Bactérias totais foram diretamente proporcionais a bactérias aeróbias em animais com placa dental, com correlação mediana (Tabela 3), confirmando que as placas dentais são formadas por bactérias aeróbias, como citado por autores anteriormente. A formação da placa dental forma um ambiente favorável para a fixação de vários microrganismos, fazendo com que à medida que aumenta a fixação de bactérias aeróbias, aumenta também a quantidade de bactérias totais na boca de cães (Harvey, 2005).

Tabela 3 - Correlação entre bactérias totais e bactérias aeróbias em cães com placa ou cálculo dentário

Grupo	Placa	Cálculo
Coefficiente de correlação	0,597	0,292
Valor de p	0,024	0,574

Teste de correlação de Pearson,  $\alpha = 5\%$ .

Bactérias totais foram diretamente proporcionais a bactérias anaeróbias em animais com placa e cálculo dental com forte correlação (Tabela 4). Demonstrando que a placa dental, além de bactérias aeróbias, também é formada por bactérias anaeróbias. Com a proliferação do biofilme, é formado um ambiente com pouca oxigenação, possibilitando a agregação de bactérias anaeróbias (Harvey, 2005).

Tabela 4 - Correlação entre bactérias totais e bactérias anaeróbias em cães com placa ou cálculo dentário

Grupo	Placa	Cálculo
Coefficiente de correlação	0,908	0,995
Valor de p	0,000	0,000

Teste de correlação de Pearson,  $\alpha = 5\%$ .

A análise de CSVs orais não mostrou diferença entre os dois grupos ( $p = 0,467$ ), com uma mediana de 2,0 ppb nos animais com cálculo dental e 1,5 ppb naqueles com placa dental. Apesar disso, os níveis de CSVs foram diretamente proporcionais à porcentagem de cocos aeróbios nos animais com placa dental, com correlação mediana, os valores variaram entre 0 e 7 ppb. (Tabela 5). Harvey (1998)

explica que cocos aeróbios são as primeiras bactérias colonizadoras, formando a placa dental, favorecendo a adesão de outras bactérias para a formação do cálculo. Mensurar níveis de CSVs é um método apropriado para determinar halitose em cães, existe uma ligação positiva entre halitose e doença periodontal, animais sem acometimento da doença tem menores níveis de CSVs e, após terapia periodontal, níveis de CSVs são reduzidos (Rawlings e Culham, 1998). Logo existe uma relação direta, o aumento dos CSVs, aumenta a halitose, que por sua vez aumenta com o grau da doença periodontal.

Tabela 5 - Correlação entre CSVs e cocos aeróbios em cães com placa ou cálculo dentário

Grupo	Placa	Cálculo
Coefficiente de correlação	0,694	-0,680
Valor de p	0,005	0,138

Teste de correlação de Pearson,  $\alpha = 5\%$ .

BALs gram positiva e catalase negativa foram observadas em somente quatro animais com placa dental, dentre eles a média foi de 4511 UFC/mL, correspondendo a 0,14% das bactérias totais. Não foi identificado em animais com cálculo dental. Pode-se considerar bactérias ácido lácticas colônias gram positivas, que se proliferam mais facilmente sob condições de anaerobiose, não formam esporos, tem formato de bastões ou cocos, catalase negativa, entre outras características específicas dos gêneros (Tannock, 1999). Estudos com *Lactobacillus rhamnosus* GG demonstram que esta BAL com alto potencial probiótico está presente na cavidade oral, porém, não tem capacidade de se fixar permanentemente (Yli-Knuutila et al. 2006).

## 5. CONCLUSÃO

A fisiologia oral é influenciada pela microbiota oral, de forma que mensurar os CSVs pode ajudar na avaliação precoce da doença periodontal em cães e o cálcio ionizado sérico parece não ter relação com a microbiota oral. Com relação a idade dos animais, cães mais velhos tendem a ter maior quantidade de bactérias totais em relação a animais jovens. De forma que, as bactérias aeróbias são as primeiras colônias a se fixarem nos dentes, formando a placa dental e as bactérias anaeróbias

estão em maior quantidade em animais com cálculo dental. Logo cães tem uma microbiota oral mista.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN VETERINARY DENTAL COLLEGE. **Veterinary dental nomenclature, Recommendations from the AVDC Nomenclature Committee adopted by the AVDC Board**, 2017. Disponível em: <https://www.avdc.org/Nomenclature.pdf>. Acesso em: 10 de novembro de 2017.

ANDRIOLO, A.; MOREIRA, S.R.; SILVA, L.A.; CARVALHO, A.B.D.; VIEIRA, J.G.H.; GHIRINGHELLO, M.T.; JULIANO, Y. Cálcio ionizado no soro: estimativa do intervalo de referência e condições de coleta. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 2, p. 85-89, 2004.

BADET, C.; THEBAUD, N.B. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. **The open microbiology journal**, v. 2, p. 38, 2008.

BORAH, B.M.; HALTER, T.J.; XIE, B.; HENNEMAN, Z.J.; SIUDZINSKI, T.R.; HARRIS, S.; ELLIOTT, M.; NANCOLLAS, G.H. Kinetics of canine dental calculus crystallization: An *in vitro* study on the influence of inorganic components of canine saliva. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 425, p. 20-26, 2014.

CARLO REIS, E.C.; BORGES, A.P.B.; DEL CARLO, R.J.D. Regeneração periodontal em cães. **Ciência Rural**, v. 41, p. 2128-2136, 2011.

CARREIRA, L.M.; DIAS, D.; AZEVEDO, P. Serum Ionized Calcium Quantification for Staging Canine Periodontal Disease: A Preliminary Study. **Topics In Companion Animal Medicine**, v. 30, n. 2, p. 48-50, 2015.

COLMERY, B. The Gold Standard of Veterinary Oral Health Care. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.35, n.4, p.781–787, 2005.

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. e83158, 2013.

DIAS, D.D.J. **Estudo dos níveis séricos de cálcio ionizado em doença periodontal em canídeos em função do sexo, idade e peso vivo**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária.

ELLIOTT, D.R.; WILSON, M.; BUCKLEY, C.M.; SPRATT, D.A. Cultivable oral microbiota of domestic dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5470-5476, 2005.

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

GRAVES, D.T.; OATES, T.; GARLET, G.P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. **Journal of oral microbiology**, v. 3, n. 1, p. 5304, 2011.

HARVEY, C.E. Periodontal disease in dogs: etiopathogenesis, prevalence, and significance. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 28, n. 5, p. 1111-1128, 1998.

HARVEY, C.E. Management of periodontal disease: understanding the options. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 35, n. 4, p. 819-836, 2005.

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 enamel. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e113744, 2014.

JIANG Q.; STAMATOVA I.; KAINULAINEN V.; KORPELA R.; MEURMAN J.H. Interactions between *Lactobacillus rhamnosus* GG and oral micro-organisms in an *in vitro* biofilm model. **BMC Microbiol**, v. 16, n. 1, p. 1-11, 2016.

KANG, J.H.; KIM, D.J.; CHOI, B.K.; PARK, J.W. Inhibition of malodorous gas formation by oral bacteria with cetylpyridinium and zinc chloride. **Archives of Oral Biology**, v. 84, p. 133-138, 2017.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 2, p. 310-347, 2009.

MILKEN, V.M.F.; SILVA, F.O.C.; REZEDE, R.J.; LIMA, T.B.F. Prevalência de cálculo dental em cães no município de Uberlândia, Minas Gerais. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zootecnia da UNIPAR**, v. 6, p. 57-60, 2003.

NIEMIEC, B.A. Periodontal disease. **Topics in companion animal medicine**, v. 23, n. 2, p. 72-80, 2008.

NORDHOFF, M.; RÜHE, B.; KELLERMEIER, C.; MOTER, A.; SCHMITZ, R.; BRUNNBERG, L.; WIELER, L.H. Association of *Treponema* spp. with canine periodontitis. **Veterinary Microbiology**, v. 127, n. 3, p. 334-342, 2008.

PIERI, F.A.; SOUZA, M.C.C.; VERMELHO, L.L.R.; VERMELHO, M.L.R.; PERCIANO, P.G.; VARGAS, F.S.; BORGES, A.P.B.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; MOREIRA, M.A.S. Use of  $\beta$ -caryophyllene to combat bacterial dental plaque formation in dogs. **BMC Veterinary Research**, v.12, p.1-8, 2016.

PIHLSTROM, B.; MICHALOWICZ, B.; JOHNSON, N. Periodontal diseases. **Lancet**, v. 366, p. 1809-1820, 2005.

RAWLINGS, J.M.; CULHAM, N. Halitosis in dogs and the effect of periodontal therapy. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 12, p. 2715S-2716S, 1998.

SCHENCK, P.A.; CHEW, D.J.; NAGODE, L.A.; ROSOL, T.J. Disorders of calcium: hypercalcemia and hypocalcemia. **Fluid, Electrolyte, and Acid-Base Disorders in Small Animal Practice**, v. 4, p. 120-194, 2006.

SCHROEDER, H.E.; SHANLEY, D. Formation and inhibition of dental calculus. **Journal of Periodontology**, v. 40, n. 11, p. 643-646, 1969.

SZABO, C.A. Timeline of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) research: from environmental toxin to biological mediator. **Biochemical Pharmacology**, v. 149, p. 5-19, 2018.

TANNOCK, G.W. Identification of lactobacilli and bifidobacteria. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 1, n. 1-2, p. 53-64, 1999.

VENTURINI, M.A.F.A.; FERRO, D.G.; CORREA, H.L.; GIOSO, M.A. Doenças da cavidade oral atendidas no Centro Odontológico Veterinário durante 44 meses – estudo retrospectivo. **Revista Nosso Clínico**, v. 59, p.6-14, 2007.

YLI-KNUUTTILA, H.; SNÄLL, J.; KARI, K.; MEURMAN, J.H. Colonization of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the oral cavity. **Oral microbiology and immunology**, v. 21, n. 2, p. 129-131, 2006.