



**CONFORME SOLICITAÇÃO DO AUTOR, ESTA
PRODUÇÃO INTELECTUAL POSSUI
RESTRIÇÃO DE ACESSO**

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**MICROBIOTA ORAL E ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES COM DOENÇA
PERIODONTAL E O POTENCIAL DE TERPENÓIDES NO CONTROLE
BACTERIANO**

MAURÍCIO DE OLIVEIRA TAVARES

CAXIAS DO SUL

2019

MAURÍCIO DE OLIVEIRA TAVARES

**MICROBIOTA ORAL E ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES COM DOENÇA
PERIODONTAL E O POTENCIAL DE TERPENÓIDES NO CONTROLE
BACTERIANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare

Coorientadores: Profa. Dra. Miriam Salvador e Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

CAXIAS DO SUL

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

T231m Tavares, Maurício de Oliveira

Microbiota oral e estresse oxidativo em cães com doença periodontal e o potencial de terpenóides no controle bacteriano [recurso eletrônico] / Maurício de Oliveira Tavares. – 2019.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.

Orientação: Ana Paula Longaray Delamare.

Coorientação: Miriam Salvador, Sergio Echeverrigaray.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Odontologia veterinária. 2. Doença periodontal. 3. Cão. I. Delamare, Ana Paula Longaray, orient. II. Salvador, Miriam, coorient. III. Echeverrigaray, Sergio, coorient. IV. Título.

CDU 2. ed.: 591:616.314

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

**MICROBIOTA ORAL E ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES COM DOENÇA
PERIODONTAL E O POTENCIAL DE TERPENÓIDES NO CONTROLE
BACTERIANO**

MAURÍCIO DE OLIVEIRA TAVARES

Dissertação submetida a banca examinadora designada pela coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em 12 de dezembro de 2019

Banca Examinadora

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare
Universidade de Caxias do Sul

Profa. Dr. Rogério Luis Cansian
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Profa. Dra. Raqueli Teresinha França
Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Mariana Roesch Ely
Universidade de Caxias do Sul

AGRADECIMENTOS

A minha Mãe minha eterna incentivadora, e meu Pai *in memoriam*.

A minha esposa e filhos que alegam meus dias, são meu apoio diário enfrentando as dificuldades que a vida nos propõe, construindo um alicerce para que eu continue a traçar meus caminhos e alcance meus objetivos.

Aos professores Dra. Ana Paula e Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna, que abriram espaço no laboratório para o desenvolvimento do meu projeto, pelos ensinamentos transmitidos, em especial a minha orientadora Dra. Ana Paula Longaray Delamare que acreditou neste trabalho e dedicou-se em todas as etapas para que ele fosse concluído. Da mesma forma a professora Dra. Miriam Salvador por sua dedicação e aprendizado.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada, pela amizade e que de alguma forma auxiliaram na realização do trabalho, especialmente Lucas, Wesley e Fernando que foram essências e incansáveis na realização dos experimentos.

Aos meus funcionários e estagiários da Vet Center Caxias que colaboraram com o projeto.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, e aos professores que fizeram parte da minha banca de acompanhamento por todo o conhecimento adquirido.

À Universidade de Caxias do Sul pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CAPES pela concessão da bolsa.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, com que se sintam humildes.”

Leonardo da Vinci

“Viver é enfrentar um problema atrás do outro. O modo como você o encara é que faz a diferença.”

Benjamin Franklin

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
ASBTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 MICROBIOTA ORAL E A DOENÇA PERIODONTAL EM CÃES	12
2.2 AGENTES ANTIMICROBIANOS PARA PROFILAXIA ORAL.....	15
2.3 COMPOSTOS TERPENÓIDES.....	17
2.4 ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA PERIODONTAL.....	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVO GERAL.....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 CAPÍTULO 1	24
BACTERIAS AERÓBICAS, FACULTATIVAS E MICROAEROFILICAS ASSOCIADAS A GENGIVITE E PERIODONTITE EM CÃES.	
4.2 CAPÍTULO 2	37
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS TERPENÓIDES SOBRE BACTÉRIAS RELACIONADAS À DOENÇA PERIODONTAL CANINA	
4.3 CAPÍTULO 3	52
DETERMINAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL.	
5 CONCLUSÕES GERAIS	60
6 BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR	62
ANEXO 1 ÁRVORE FILOGENÉTICA GRUPO SAUDÁVEL	73
ANEXO 2 ÁRVORE FILOGENÉTICA GRUPO GENGIVITE	74
ANEXO 3 ÁRVORE FILOGENÉTICA GRUPO PERIODONTITE	75
ANEXO 4 TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO	76
ANEXO 5 FICHA ODONTOLÓGICA	79

LISTA DE TABELAS

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROBIOTA ORAL E A DOENÇA PERIODONTAL EM CÃES.

Tabela 1. Comparativo dos filamentos encontrados nos estudos de Dewhirst et al (2012), Davis (2013) e Holcomb et al (2014). Fonte: Davis, (2016)14

CAPÍTULO 1

Tabela 1- Número de isolados bacterianos obtidos de cães saudáveis, com gengivite e com periodontite, classificados por filo.....29

Tabela 2- Gêneros e espécies bacterianas mais prevalentes em amostras de cães saudáveis, com gengivite e com periodontite.....33

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Concentrações obtidas para DL50, CIM e CBM.....44

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Pacientes selecionados por grupo de estudo e suas características individuais.....56

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Análise filogenética dos isolados bacterianos de cães saudáveis (A), com gengivite (B) e com periodontite. As barras representam os filos Actinobacteria (vermelho), Firmicutes (amarelo), Bacteroidetes (verde) e Proteobacteria (azul).....34
- Figura 2.** Presença dos gêneros bacterianos distribuídos por indivíduo, em cães saudáveis, com gengivite e com periodontite.....35

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Estrutura química dos compostos testados, apresentando diferentes grupos funcionais, mas estrutura molecular semelhante.....42
- Figura 2.** Curva de viabilidade (log de UFC/ml) de *Frederiksenia canicola* na presença de distintas concentrações de terpenóides (0 a 1,56 mM) versus tempo (horas). (A) Citral e (B) Citronelal. As curvas tiveram um CV inferior a 5%.....46
- Figura 3.** Curva de viabilidade (log de UFC/ml) de *Neisseria zoodegmatis* na presença de distintas concentrações de terpenóides (0 a 1,56 mM) versus tempo (horas). (A) Citral e (B) Citronelal. As curvas tiveram um CV inferior a 5%.....47

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Valores obtidos para capacidade antioxidativa total (TEAC) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no grupo controle, grupo com periodontite pré tratamento (P1) e pós tratamento (P2)58

RESUMO

A doença periodontal é uma enfermidade inflamatória e bacteriana que acomete os tecidos de suporte e sustentação dos dentes e tem grande importância na clínica de pequenos animais visto a grande incidência em cães já nos primeiros anos de vida. Conhecendo os microrganismos envolvidos nesse processo podemos determinar a patogenia da doença e como ocorre a instalação das lesões periodontais de acordo com a ação dessas bactérias, assim como elaborar novos protocolos de tratamento. O objetivo desse trabalho foi identificar as bactérias presentes na microbiota oral de cães saudáveis, com gengivite e com periodontite, testar a ação de terpenos frente às bactérias isoladas e verificar a presença de estresse oxidativo na doença periodontal. Foram isoladas e identificadas 177 bactérias pertencentes a 4 filos e 27 gêneros diferentes. No grupo saudável a maior parte dos isolados identificados pertenceram aos gêneros *Staphylococcus* spp., *Neisseria* spp., *Actinomyces* spp., *Chryseobacterium* spp., *Proteus* spp., enquanto cães do grupo gengivite e periodontite apresentaram maior prevalência de *Neisseria* spp., *Actinomyces* spp., *Corynebacterium* spp., *Pasteurella* spp. Com a progressão da doença periodontal foi observado importante aumento de *Neisseria* sp. e de *Corynebacterium* sp. indicando que espécies destes gêneros ou o desequilíbrio provocado pelo seu aumento, podem ter papel importante na doença periodontal em cães. Os testes com terpenos foram realizados por diluição seriada dos terpenóides citral, geraniol, citronelal, alfa-terpineol, citronelol e terpineno 4ol sobre as bactérias *Fredericksenia canicola*, *Neisseria zoodegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus pseudointermedius*, selecionadas para os testes pela maior viabilidade dos isolados. Os terpenos citral, geraniol, citronelol e α -terpineol obtiveram os melhores resultados, similares e até superiores ao composto xilitol. Podemos concluir que os terpenos testados possuem propriedades antibacterianas e inibitórias frente às bactérias *F. canicola*, *N. zoodegmatis* e *S. pseudointermedius*, e dessa forma potencial uso para controle da doença periodontal em cães. A análise do estresse oxidativo gerado na doença periodontal pode ser um biomarcador de lesão tecidual e agravamento da enfermidade, para isso foi realizada a quantificação da peroxidação lipídica (TBARS) e da capacidade antioxidante total (TEAC) de cães com periodontite. O estudo traz evidências da presença do estresse oxidativo na doença periodontal, visto que ocorreu um aumento significativo de TBARS de 43,81% em relação ao grupo controle e ainda sugere uma melhora da capacidade antioxidativa após tratamento, pois observou-se aumento de TEAC de 8% no grupo de cães tratados.

Palavras Chave: doença periodontal, estresse oxidativo, terpenos, microbiota oral

ABSTRACT

Periodontal disease is an inflammatory and bacterial disease that affects the supporting and supporting tissues of teeth and is of great importance in the clinic of small animals, given the high incidence in dogs in the first years of life. Knowing the microorganisms involved in this process we can determine the pathogenesis of the disease and how the periodontal lesions occur according to the action of these bacteria, as well as elaborate new treatment protocols. The objective of this study was to identify the bacteria present in the oral microbiota of healthy dogs and those with gingivitis and periodontitis, to test the action of terpenes against isolated bacteria and to verify the presence of oxidative stress in periodontal disease. A total of 177 bacteria belonging to 4 phyla and 27 different genera were isolated and identified. In the healthy group most of the identified isolates belonged to the genera *Staphylococcus* spp., *Neisseria* spp., *Actinomyces* spp., *Chryseobacterium* spp., *Proteus* spp., *Corynebacterium* spp., *Pasteurella* spp. With the progression of oral disease, a significant increase in *Neisseria* sp. and *Corynebacterium* sp. indicating that species of these genera or the imbalance caused by their increase may play an important role in periodontal disease in dogs. Terpene tests were performed by serial dilution of the citral, geraniol, citronellal, alpha-terpineol, citronellol and terpinene-4-ol on *Fredericksonia canicola*, *Neisseria zoodegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus pseudointermedius*. The citral terpenes, geraniol, citronellol and α -terpineol obtained the best results, similar and even superior to the compound xylitol. We can conclude that the tested terpenes have antibacterial and inhibitory properties against the bacteria *F. canicola*, *N. zoodegmatis* and *S. pseudointermedius*, and thus potential use for periodontal disease control in dogs. The analysis of oxidative stress generated in periodontal disease can be a biomarker of tissue injury and disease worsening. For this purpose, the lipid peroxidation (TBARS) and total antioxidant capacity (TEAC) of dogs with periodontitis were quantified. The study provides evidence of the presence of oxidative stress in periodontal disease, as there was a significant increase in TBARS of 43.81% compared to the control group and also suggests an improvement in antioxidant capacity after treatment, as an increase in TEAC was observed. 8% in the group of dogs treated

Keywords: periodontal disease, oxidative stress, terpenes, oral microbiota.