

## ***Porphyromonas gingivalis* na cavidade oral de neonatos da raça Bulldog Inglês**

*Porphyromonas gingivalis* in the Oral Cavity of English Bulldog Newborn Puppies

**Andresa de Cássia Martini<sup>1</sup>, Lianna Ghisi Gomes<sup>1</sup>, Letícia Camara Pitchenin<sup>1</sup>, Fábio Dumit Pizzinato<sup>1</sup>, Dábila de Araújo Sônego<sup>1</sup>, Emanuelle Denise de Brito Almeida<sup>2</sup>, Paulo Roberto Spiller<sup>3</sup>, Murilo de Souza Mendes da Costa<sup>4</sup>, Luciano Nakazato<sup>5</sup> & Roberto Lopes de Souza<sup>5</sup>**

### ABSTRACT

**Background:** Periodontal disease (PD) is the most common disease of the oral cavity in cats and dogs, and it affects up to 80% of these animals. PD begins with the accumulation of bacteria on the surface of the teeth, and it poses a risk for the health of pets. Research on PD in dogs has focused on the identification and characterization of bacterial communities present in the oral cavity. *Porphyromonas gingivalis* is highly prevalent in the oral cavity. Therefore, the aim of this study was to detect *P. gingivalis* before and after dental eruption in 15 English bulldog newborn puppies, hoping to contribute to early guidance of oral hygiene management and prevent future PD.

**Materials, Methods & Results:** Fifteen English bulldog newborn puppies were used in this study. Two groups (G1 and G2) were formed with eight and seven puppies, respectively. Oral swab samples were taken from the maxillary incisor region of animals from G1 and G2 10 days after birth (T10). At this moment, the clinical evaluation of the oral cavity showed healthy gums with a thin, shiny, pinkish, and firm margin, without any odor or granular appearance, and with no tooth eruption. On postnatal day 25 (T25), a subgingival sample was collected with a Gracey curette from the maxillary incisors; the oral cavity examination revealed healthy gums and presence of gingival sulcus. Bilateral subgingival samples were also collected from the maxillary canines and fourth premolars of the dams at T10 and T25. All newborn puppies were fed maternal breast milk and supplementation exclusively with commercial milk for dogs in individual bottles. The dams were fed commercial dry food. The average weight of G1 and G2 at T10 was  $625.87 \pm 85.26$  g and  $543.50 \pm 92.88$  g, respectively, and 100% (15/15) of the animals were negative for PG as assessed by polymerase chain reaction (PCR) on oral swab samples. At T25, puppies from groups G1 and G2 weighed  $1.465 \pm 194$  g and  $1.206 \pm 201$  g, respectively, and 100% (15/15) of the puppies were positive for *P. gingivalis* as assessed by PCR on subgingival samples collected with a Gracey curette. The dams of the puppies in G1 and G2 were positive for PG at T10 and T25 as determined by PCR on subgingival samples.

**Discussion:** An important finding of this study was that the dams of the puppies in G1 and G2 were positive for *P. gingivalis* at T10. Several species of bacteria that cause periodontal disease can be transmitted from humans to pets; therefore, transmission from dam to puppy would be possible, but was not observed in this study at T10, when 100% (15/15) of the animals were negative for *P. gingivalis*. Subgingival microbiota associated with periodontitis consists essentially of *Porphyromonas* spp., and the presence of gingival sulcus and dental eruption are determinant factors for the presence of *P. gingivalis* in the oral cavity. Nevertheless, the hygiene habits of dogs, with the dam licking the puppies after dental eruption, could have been a relevant factor for transmission and appearance of *P. gingivalis* in the subgingival sample in 100% (15/15) of the puppies at T25. The oral microbiota is closely related to many diseases, and resident pathogenic oral bacteria can be transferred by close contact. Certain species of bacteria present in the subgingival biofilm exhibit higher etiologic relevance during the onset and progression of periodontitis, and *Porphyromonas* spp. is among the most important of these species. It is important to keep in mind that age is a relevant factor to prevent periodontitis. Therefore, providing owners with instructions for thorough dental brushing of animals when they still have deciduous teeth can prevent the appearance of future PD.

**Keywords:** doença periodontal, erupção dentária, escovação dentária.

**Descritores:** periodontal disease, dental eruption, tooth brushing.

## INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) é a moléstia mais comum da cavidade oral de cães e gatos, afetando até 80% dos animais, inicia-se pelo acúmulo de bactérias na superfície dos dentes, sendo uma preocupação para a saúde dos animais de companhia. Pesquisas sobre DP na espécie canina tem se concentrado na identificação e caracterização das comunidades bacterianas presentes na cavidade oral [13,14]. Fatores inerentes ao hospedeiro como idade, raça, sexo, mastigação, má oclusão, retenção de dentes decíduos, anomalias dentais, alimentação e condições sistêmicas podem determinar severidade e progressão da doença periodontal [2,6,8].

A formação da placa dentária começa após a erupção dos dentes, formando-se em poucos minutos um filme acelular na superfície dentária composta de glicoproteínas salivares, polipeptídeos e lipídios [3]. As bactérias, por meio de seu metabolismo, produzem enzimas e toxinas que lesam as estruturas periodontais, iniciando uma resposta inflamatória e contribuindo para sua proliferação [11,16].

*Porphyromonas gingivalis* é uma bactéria gram negativa anaeróbia, e tem sido identificada como um importante patógeno periodontal devido sua virulência [18]. Um estudo relatou um caso de DP grave em um cão de três meses de idade, salientando a importância de se iniciar cuidados com a higiene oral, ainda na dentição decídua [5].

Sendo *P. gingivalis* uma bactéria altamente prevalente na cavidade oral objetivou-se avaliar sua presença antes e após erupção dentária de 15 neonatos da raça Bulldog Inglês.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Delineamento experimental*

Foram utilizados 15 neonatos da raça Bulldog Inglês, sendo G1 e G2 o nome dado aos grupos, com 8 e 7 neonatos respectivamente. Realizou-se *swab* da cavidade oral na região maxilar incisiva de G1 e G2 aos 10 dias de nascimento (T10), ao exame clínico da cavidade oral apresentavam gengiva com aspecto saudável, margem fina, brilhante, rósea, firme, sem odor e aspecto granuloso, sem erupção dentária. Aos 25 dias (T25) realizou-se a coleta subgengival com cureta Gracey dos incisivos maxilares, e ao exame da cavidade oral a gengiva mostrava aspecto saudável e com a presença de sulco gengival. Procedeu-se a coleta

subgengival dos caninos e 4° pré- molares bilaterais das progenitoras com cureta de Gracey, em T10 e T25 e à análise visual foram classificadas de acordo com outros autores [1], em grau 2 de DP, onde observou-se gengivite moderada; inflamação da gengiva com edema; gengiva avermelhada, inchada e com ligeiro enrolamento de margem.

Todos os neonatos recebiam alimentação a base de leite materno e suplementação em mamadeira individual com leite comercial para cães exclusivamente, as progenitoras eram alimentadas com ração comercial seca.

### *Análise molecular*

O material foi depositado em microtubos contendo 500 µL de solução fisiológica 0,9% e mantidas a -18°C até o momento da extração de DNA genômico. A extração genômica foi realizada através do método de fenol-clorofórmio de acordo com outro estudo [15]. As amostras extraídas foram submetidas à reação em cadeia de polimerase (PCR), sendo cada reação composta 2,0 µL de DNA genômico, 1,25 x Tampão 10x, 0,25 Mm dNTPs, 10 pMol do primer, 0,5 U Taq DNA polimerase<sup>1</sup> e água ultrapura q.s.p. para volume final de 20 µL. Utilizando termociclador My Cycler<sup>2</sup> as reações foram amplificadas com desnaturação inicial de 5 min a 95°C, sucedido de 30 ciclos de desnaturação por 45 s a 95°C, hibridização por 30 s a 55°C e 30 s a 72°C de extensão, sendo concluída com um ciclo de extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0%, corado com Gel Red<sup>TM3</sup> a 10 V/cm e visualizados em foto documentador ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS<sup>2</sup> utilizando o software ImageLab<sup>TM</sup>. O marcador de massa molecular empregado foi o Ladder 100pb<sup>4</sup>.

## RESULTADOS

O peso médio do G1 e G2 foi de 625.87 ± 85.26 e 543.50 ± 92.88 g respectivamente em T10, e 100% (15/15) dos animais foram negativos para *Porphyromonas gingivalis* através da análise por reação em cadeia de polimerase (PCR) do swab da cavidade oral. Em T25 os filhotes dos grupos G1 e G2 pesaram 1.465 ± 194 e 1.206 ± 201 g respectivamente, e 100% (15/15) dos filhotes foram positivos para PG através da análise de PCR do produto subgengival coletado com cureta de Gracey (Tabela 1). As progenitoras de G1 e G2 foram positivas para PG em T10 e T25, através da coleta subgengival e análise de PCR.

**Tabela 1.** Resultados da análise de PCR da cavidade oral de neonatos da raça Bulldog Inglês para os grupos G1 e G2 nos tempos T10 e T25.

Animal	T10	T10	T25	T25
	G1	G2	G1	G2
1	-	-	+	+
2	-	-	+	+
3	-	-	+	+
4	-	-	+	+
5	-	-	+	+
6	-	-	+	+
7	-	-	+	+
8	-	-	+	+

G1(grupo 1); G2 (grupo 2); T10 (10 dias de nascimento) e T25 (25 dias de nascimento).

## DISCUSSÃO

Através da análise visual da cavidade oral, os neonatos de G1 e G2 em T10 apresentavam gengiva com aspecto saudável, margem fina, brilhante, rósea, firme, sem odor e aspecto granulado, sem erupção dentária, o *swab* da cavidade oral revelou que todos os neonatos de ambos os grupos foram negativos para *P. gingivalis*, outros autores em seu estudo [9] observaram ao exame clínico que nenhum cão do grupo jovem foi afetado por periodontite e tinham baixa frequência de *P. gingivalis* na cavidade oral, contudo a idade do grupo nesse estudo compreendia de 0 a 2 anos, diferindo do nosso estudo que abordou a idade neonatal. As progenitoras das ninhadas no tempo T10 foram positivas para *P. gingivalis*, sendo um importante dado a ser relatado, várias espécies periodontopáticas podem ser transmitidas entre os seres humanos e seus cães de companhia [17], portanto a transmissão de mãe para filho seria possível, mas não foi observada nesse estudo no T10. Sabe-se que a microbiota subgengival associada à periodontite, consiste essencialmente de *Porphyromonas* spp. [4] e a presença do sulco gengival e erupção dentária são fatores determinantes para presença de *P. gingivalis* na cavidade oral.

Em T25 ambos os grupos e suas respectivas progenitoras foram positivos para *P. gingivalis* através da análise de PCR do produto subgengival coletado com cureta Gracey, aos neonatos observou-se mesmo com a presença de *P. gingivalis* na cavidade oral, gengiva de aspecto saudável, margem fina, brilhante, rósea, firme, sem odor e aspecto granulado, com erupção dentária. *P. gingivalis* é considerado o patógeno mais importante no desenvolvimento e progressão da doença inflamatória crônica [10], corroborando com o observado nas progenitoras de ambos os grupos que foram classificadas como grau II de doença periodontal. A microbiota oral, está intimamente associada a muitas doenças, e as bactérias orais patogênicas residentes,

podem ser transferidas por contato físico próximo [12]. O hábito de limpeza dos filhotes através da lambedura da mãe e o contato entre irmãos pode ter sido um fator relevante para o aparecimento de *P. gingivalis* na cavidade oral no T25, sabe-se que a microbiota subgengival associada à periodontite, consiste essencialmente de *Porphyromonas* spp. [7]. A literatura registra um caso de doença periodontal grave em um cão de três meses de idade, salientando a importância de se iniciar cuidados com a higiene oral, ainda na dentição decídua [5].

A fim de prevenir a doença periodontal, é importante ter em mente que a idade é um fator importante e a orientação sobre escovação completa dos animais pelos proprietários deve ser para prevenir o aparecimento da periodontite [9].

## CONCLUSÃO

Conclui-se que *Porphyromonas gingivalis* é uma bactéria altamente prevalente na cavidade oral de neonatos após a erupção dentária com sulco gengival presente. Portanto os cuidados com higiene oral e utilização de pastas orais veterinárias são indicados prematuramente, prevenindo assim futura doença periodontal.

## MANUFACTURERS

<sup>1</sup>Sigma-Aldrich Co. São Paulo, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Bio-Rad Laboratórios Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Biotium Corporate Headquarters. Hayward, CA, USA.

<sup>4</sup>Ludwig Biotecnologia Ltda. Alvorada, RS, Brazil.

**Acknowledgements.** Agradecimentos ao CNPq pela bolsa de produtividade concedida a Luciano Nakazato.

**Ethical approval.** Este estudo teve aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), sob protocolo de número 23108.135278/2016-70.

**Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

#### REFERENCES

- 1 Beard G.B. & Beard D.M. 1989. Geriatric dentistry. *Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice*. 19(1): 49-74.
- 2 Burt B. 2005. Epidemiology of Periodontal Diseases. *Journal of Periodontology*. 76(8): 1406-1419.
- 3 Busscher H.J. & Van Der Mei H.C. 1997. Physico - chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Advances in Dental Research*. 11(1): 24-32.
- 4 Carvalho C. & Cabral C. 2007. Papel da *Porphyromonas gingivalis* na doença periodontal. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilo Facial*. 48(1): 167-171.
- 5 Carvalho V.G.G. 2010. Por que Examinar a Cavidade Oral de Filhotes? Relato de Caso. *Revista da Anclivepa São Paulo*. XXI(58): 2008.
- 6 Gawor J.P., Reiter A.M., Jodkowska K., Kurski G., Wojtacki M.P. & Kurek A. 2006. Influence of diet on oral health in cats and dogs. *Journal of Nutrition*. 136(7): 2021S-2023S.
- 7 Hardham J., Dreier K., Sfintescu C. & Evans R.T. 2005. Pigmented anaerobic bacteria associated with canine periodontitis. *Veterinary Microbiology*. 106(1-2): 119-128.
- 8 Harvey C.E., Thornsberry C. & Miller B.R. 1995. Subgingival bacteria - comparison of culture results in dogs and cats with gingivitis. *Journal Veterinary Dentistry*. 12(4): 147-150.
- 9 Hirai N., Shirai M., Kato Y., Murakami M., Nomura R., Yamasaki Y., Takahashi S., Kondo C., Matsumoto-Nakano M., Nakano K. & Asai F. 2013. Correlation of age with distribution of periodontitis-related bacteria in Japanese dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*. 75(7): 999-1001.
- 10 Khalaf H., Nakka S.S., Sandén C., Svärd A., Hultenby K., Scherbak N., Aili D. & Bengtsson T. 2016. Antibacterial effects of *Lactobacillus* and bacteriocin PLNC8  $\alpha\beta$  on the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiology*. 16(188): 1-11.
- 11 Lacerda M.S. & Alessi A.C. 2002. Avaliação histobacteriológica de dentes envolvidos com doença periodontal em cães, após raspagem periodontal. *Journal of Bioscience*. 18(1): 137-149.
- 12 Oh C., Lee K., Cheong Y., Lee S.W., Park S.Y., Song C.S., Choi I.S. & Lee J.B. 2015. Comparison of the Oral Microbiomes of Canines and Their Owners Using Next- Generation Sequencing. *Plos One*. 10(7): 1-15.
- 13 Patel N., Colyer A., Harris S., Holcombe L. & Andrew P. 2016. The Prevalence of Canine Oral Protozoa and Their Association with Periodontal Disease. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 64(3): 286-292.
- 14 Riggio M.P., Lennon A., Taylor D.J. & Bennett D. 2011. Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. *Veterinary Microbiology*. 150(3-4): 394-400.
- 15 Sambrook J. & Russel D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp.565-567.
- 16 West-hyde L. & Floyd M. 1997. Odontologia. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. (Eds). *Tratado de Medicina Interna Veterinária. Moléstias do cão e do gato*. 4.ed. São Paulo: Manole, pp.1523-1524.
- 17 Yamasaki Y., Nomura R., Nakano K., Naka S., Matsumoto-Nakano M., Asai F. & Ooshima T. 2012. Distribution of periodontopathic bacterial species in dogs and their owners. *Archives of Oral Biology*. 57(9): 1183-1188.
- 18 Yokoama K., Sugano N., Rahman A.K.M.S., Oshika-wa M. & Ito K. 2007. Activity of anti-*Porphyromonas gingivalis* egg yolk antibody against gingipains *in vitro*. *Oral Microbiology and Immunology*. 22(5): 352-355.

