

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MILENA DOMINGUES LACERENZA

Avaliação de cáries, diastemas, microbioma bucal e pH da cavidade oral em equinos alimentados com alto teor de carboidratos solúveis na dieta

Pirassununga

2022

MILENA DOMINGUES LACERENZA

Avaliação de cáries, diastemas, microbioma bucal e pH da cavidade oral em equinos alimentados com alto teor de carboidratos solúveis na dieta

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Administração do programa de “Mestrado em Ciências”

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientadora: Profa. Dra. Renata Gebara Sampaio Dória

Pirassununga

2022



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
SCAPACADIN/CBIA

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de
São Paulo - FZEA/USP

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "CORRELAÇÃO ENTRE CÁRIES E MICROBIOMA BUCAL EM EQUINOS ALIMENTADOS COM CANA DE AÇÚCAR.", protocolada sob o CEUA nº 1167131219 (ID 001412), sob a responsabilidade de **Renata Gebara Sampaio Dória e equipe; Milena Domingies Lacerenza** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 28/01/2020.

We certify that the proposal "CORRELATION BETWEEN CARIES AND ORAL MICROBIOMA IN EQUINES FEEDED WITH SUGAR CANE.", utilizing 20 Equines (males and females), protocol number CEUA 1167131219 (ID 001412), under the responsibility of **Renata Gebara Sampaio Dória and team; Milena Domingies Lacerenza** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 01/28/2020.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 01/2020 a 01/2021

Área: Medicina Veterinária

Origem: Animais provenientes de doação espontânea

Espécie: Equídeos

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 5 a 9 anos

N: 20

Linhagem: Sem raça definida

Peso: 200 a 400 kg

Local do experimento: Nas dependências do Setor de Clínica e Cirurgia de Equinos, da Unidade Didática Clínico Hospitalar (UDCH), da FZEA/USP, em parceria com o Centro de Apoio ao Ensino e Pesquisa (CAEP), da FMVZ/USP, em Pirassununga - SP

Pirassununga, 21 de julho de 2022

Profa. Dra. Luciane Silva Martello
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Profa. Dra. Fabiana Fernandes Bressan
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D642a Domingues Lacerenza, Milena
Avaliação de cáries, diastemas, microbioma bucal
e pH da cavidade oral em equinos alimentados com
alto teor de carboidratos solúveis na dieta /
Milena Domingues Lacerenza ; orientador Renata
Gebara Sampaio Dória ; coorientador Rodrigo Romero
Corrêa. -- Pirassununga, 2022.
77 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Odontologia equina. 2. Cárie Periférica. 3.
Microbiologia molecular . 4. Nutrição. 5. Ph
cavidade oral. I. Gebara Sampaio Dória, Renata ,
orient. II. Romero Corrêa, Rodrigo , coorient. III.
Título.

Avaliação de cáries, diastemas, microbioma bucal e pH da cavidade oral em equinos alimentados com alto teor de carboidratos solúveis na dieta

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de “Mestre em Ciências”

Área de Concentração: Biociência Animal

Aprovado em: ___/___/_____.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____
Instituição _____

Presidente da Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____ Instituição _____

Prof.(a) Dr.(a) _____ Instituição _____

Prof.(a) Dr.(a) _____ Instituição _____

Aos meus pais, à minha irmã, à minha filha e ao meu esposo, que são minha base e meu porto seguro. Agradeço pelo amor e pelo apoio de todos. Dedico esse trabalho a vocês

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, pela oportunidade e por ter colocado pessoas tão especiais na minha vida durante essa etapa. Que Ele continue nos abençoando.

Aos meus pais, agradeço de coração pelo amor incondicional, pelo apoio em todas as horas.

À minha família, que tive o privilégio de formar...

Primeiramente agradeço à minha filha, que nasceu durante esse período do mestrado e me mostrou o que realmente significa amor e amar, obrigada pituca.

Também agradeço meu esposo Thiago, que esteve sempre ao meu lado, e posso dizer com muita certeza que foi a pessoa que mais me apoiou e incentivou durante todo esse processo. Obrigada por ser mais que um esposo, ser um companheiro de vida, com esse coração enorme, que nunca mediu esforços para me socorrer e ajudar durante esses anos todos.

Por último, mas não menos importante (sem ele nossa família não seria completa), ao Bóris... primeiro filho peludo, muito amado e que me trouxe muito carinho e alegrias durante todos esses anos.

Aos mestres...

Renata Gebara Sampaio Dória que aceitou essa empreitada de orientação e que fez o melhor que pôde para que o trabalho fosse executado. Tenho um carinho e agradecimento especial à ela, que me acompanha desde a graduação, foi minha orientadora de iniciação científica, de estágio curricular e esteve sempre presente em minha vida pessoal e profissional, muito obrigada prof. Ainda a professorara Rentas, gostaria de agradecer pela sua extrema atenção, dedicação, paciência, senso crítico, amizade e confiança ao longo desses anos. Sou eternamente grata pela oportunidade de ter sido sua orientada. Você é e sempre será um grande exemplo para mim.

Ao Doutor Rodrigo Romero Corrêa pela ajuda na execução do projeto e ter aceito ser meu coorientador. Obrigada por fornecer todo o equipamento odontológico para as coletas, o empenho em se deslocar para que as mesmas aconteçam e também obrigada à seus orientados Aymara e Diego, por abraçar esse projeto e vestir a camisa.

Ao Maurício Bittar, por ter sido minha primeira inspiração profissional na área de odontologia equina, me mostrou esse universo incrível dentro da clínica equina. Como o excepcional profissional que é, me inspirou, aconselhou e acompanhou de perto a

execução prática de todo o projeto

À Júlia Arantes, que além de companheira de equipe, eu tenho o privilégio de ter também como amiga. Você me inspira todos os dias na determinação e execução impecável de tudo que faz. Obrigada por todos os conselhos, pela animação nas horas difíceis desse processo, mas sobretudo por toda ajuda no desenvolvimento de todas as etapas desse projeto. Se eu tivesse que dividir meu título com alguém, com certeza seria com você, peça chave para que o trabalho tenha saído como saiu. Obrigada Juju, tenho certeza que você será uma excelente professora, orientadora e cirurgiã de equinos, continue firme e forte nessa jornada.

Ao Doutor Alexandre Gobesso, pela primeira oportunidade de estágio e iniciação científica na área de equinos. Obrigada pela orientação durante a graduação, por mais que hoje minha atuação profissional acabou indo 100% na direção da odontologia de pequenos animais, meu coração e paixão pelos cavalos ficarão sempre presentes e parte dessa história de relacionamento com essa espécie tão incrível eu devo a você e todos que guardo no coração da minha época de Labequi. Obrigada por me inspirar sempre e fazer pensar na nutrição junto à clínica.

Obrigada à toda equipe do Lacre (LACCREEEE!!)...

Desde os funcionários da UDCH, que sempre me trataram com muito carinho e estiveram sempre dispostos à me ajudar, sendo transportando 21 animais para dentro e fora da universidade, me ajudando a carregar fardos de feno ou simplesmente pela companhia de bater um papo e observar os animais, obrigada! Vocês talvez não façam ideia da diferença que fazem no nosso dia a dia.

Obrigada em especial também ao Gustavo, Marília, Pedro e Bianca, que foram desde meus primeiros estágios no hospital, colegas incríveis que fizeram desses anos muito especiais, obrigada pela amizade de vocês e por todo trabalho em equipe que desempenhamos, com muita sincronia diga-se de passagem.

Obrigada a todos os estagiários e ICs pela força no desenvolvimento prático do experimento, espero que este tenha sido uma fonte de aprendizado e inspiração pra vocês.

Por último, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001"

RESUMO

LACERENZA, M. D. **Avaliação de cáries, diastemas, microbioma bucal e pH da cavidade oral em equinos alimentados com alto teor de carboidratos solúveis na dieta** 2022. 76 f. Defesa (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

O objetivo deste trabalho foi avaliar se cavalos com alimentação com alto teor de carboidratos solúveis, à base de cana de açúcar, terão maior presença de cáries periféricas e infundibulares, menor pH da cavidade oral, maiores índices de diastemas, além de alteração no perfil de microbioma da cavidade oral, quando comparados com equinos alimentados à pasto, com gramínea *Cynodon* spp. Foram selecionados 20 animais, machos e fêmeas, hípidos, com faixa etária média de 7,5 anos, com peso corpóreo entre $473 \pm 34,75$ kg, sem raça definida, com a mesma dieta a pelo menos 3 anos, distribuídos em dois grupos experimentais, sendo eles Grupo Alto Teor de Carboidratos Solúveis (GATCS), composto por 10 equinos que possuíam histórico de alimentação com volumoso de cana de açúcar e Grupo Baixo Teor de Carboidratos Solúveis (GBTCS), composto por 10 equinos que possuíam histórico de alimentação a pasto, com gramínea *Cynodon* spp. A presença, tipo e grau de cáries e diastemas foram avaliadas com auxílio de oroscópio oral adaptado para equinos e documentadas por meio de fotografias. De cada animal, em ambos os grupos experimentais, foi realizada a colheita de amostras de saliva, de diferentes regiões da cavidade oral, para avaliação do pH e para avaliação da microbiota oral, por meio de sequenciamento de nova geração. Foi realizada análise estatística dos resultados, empregando-se o teste t de Student, para as comparações de dados quantitativos (pH) e paramétricos, considerados significativos valor de p menor que 5% ($p < 0,05$). Para as variáveis que não atenderam as premissas estatísticas, variáveis qualitativas, foi realizado o teste de Mann-Whitney (teste de Wilcoxon). Foram verificadas diferenças, entre os grupos avaliados, em relação à presença de cáries periféricas ($p = 0,001$), ao grau ($p = 0,010$) e à classe ($p = 0,05$). Não foi encontrada diferença entre grupos quanto ao pH da cavidade oral. Na avaliação de microbiota oral, para o índice de

Chao, índice invertido de Simpson e índice de Shannon não foram observadas diferenças entre os grupos ($p > 0,05$). Em relação à abundância relativa, foi observada diferença entre GBTCS e GATCS ($p = 0,003$). Quanto à Análise Discriminante Linear (LDA Score), os filos *Candidatus Saccharibacteria* e *Bacteroidetes* apresentaram diferença no GATCS, e *Cyanobacteria_Chloroplast* e *Proteobacteria* para os GBTCS. Observou-se que mais de 35 gêneros de microorganismos apresentaram diferença ($LDA > 2$) entre os grupos GBTCS e GATCS. Conclui-se que o perfil alimentar dos cavalos influencia a doença cariogênica e o perfil da microbiota oral.

Palavras-chave: Microbiologia molecular. Nutrição. Odontologia equina.

ABSTRACT

LACERENZA, M.D. **Evaluation of caries, diastema, oral microbiome and pH of the oral cavity in horses fed a high soluble carbohydrates in the diet.** 2022. 76 f. M.Sc. - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

The objective of this study was to evaluate whether horses fed with a high content of soluble carbohydrates, based on sugar cane, will have a greater presence of peripheral and infundibular caries, lower pH of the oral cavity, higher diastema index, in addition to changes in the profile of oral cavity microbiome, when compared to pasture-fed horses with *Cynodon* spp. Were selected 20 animals, males and females, healthy, 7,5 years, with body weight between $473 \pm 34,75$ kg, of mixed breed, distributed in two experimental groups, namely the High Soluble Carbohydrates Group (GATCS), composed of 10 horses that had a history of feeding with sugarcane roughage and the Low Soluble Carbohydrates Group (GBTCS), composed of 10 horses that had a history of feeding on pasture, with grass *Cynodon* spp. The presence, type and degree of caries and diastema were evaluated with the aid of an oral oroscope adapted for horses and documented through photographs. Samples of salivary pH were collected from each animal in both experimental groups; and collected sterile swabs for sequencing with an Illumina MiSeq. For variables that did not meet the statistical premises, qualitative variables, the Mann-Whitney test (Wilcoxon test) was performed. For comparisons involving quantitative (pH) and parametric data, Student's t test was used, considering p-values less than 5% ($p < 0.05$) as significant. Differences were observed between the evaluated groups in relation to the presence of peripheral caries ($p = 0.001$), grade ($p = 0.010$) and class ($p = 0.05$). No difference was found between groups regarding the pH of the oral cavity. In the evaluation of the oral microbiota, for the Chao index, inverted Simpson index and Shannon index, no differences were observed between the groups ($p > 0.05$). Regarding relative abundance, a difference was observed between GBTCS and GATCS ($p = 0.003$). Regarding the Linear Discriminant Analysis (LDA Score), the phyla Candidatus Saccharibacteria and Bacteroidetes showed differences in the GATCS, and Cyanobacteria_Chloroplast and Proteobacteria for the GBTCS. It was observed that more

than 35 genera of microorganisms showed a difference (LDA>2) between the GBTCS and GATCS groups. It is concluded that the feeding profile of horses influences the cariogenic disease and the profile of the oral microbiota.

Keyword: Equine dentistry. Nutrition. Molecular microbiology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Cáries periféricas e infundibulares	21
2.2	Dietas com alto teor de carboidratos solúveis	23
2.3	Composição e produção de saliva	24
2.4	pH e biofilme da placa bacteriana	26
2.5	Microbiota da cavidade oral	28
3	HIPÓTESE	31
4	OBJETIVO	32
4.1	Objetivos específicos	32
5	MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1	Local e animais	33
5.2	Exclusão dos animais	33
5.3	Histórico alimentar dos animais	34
5.4	Avaliação da cárie periférica e infundibular na cavidade oral	34
5.5	Microbiota da cavidade oral	39
5.6	Avaliação do pH da cavidade oral	40
5.7	Análise bromatológica dos alimentos	41
5.8	Análise estatística	42
6	RESULTADOS	43
7	DISCUSSÃO	61

8	CONCLUSÕES	70
9	REFERÊNCIAS	71

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclagem de pH na placa dentária humana dependente da frequência da ingestão de carboidratos fermentáveis: (a) comer três vezes ao dia; (b) comer seis vezes ao dia e (c) comer nove vezes ao dia. As setas indicam o tempo de ingestão de alimentos. As linhas vermelhas quebradas representam o pH crítico sob o qual ocorre a desmineralização e acima do qual pode ocorrer a remineralização 26
- Figura 2.** Imagens do acervo pessoal dos animais do GATCS representadas de 1 a 10 e GBTCS de 11 a 20 após sedação no primeiro contato com a cavidade oral, a qual também foi realizada imagens através da oroscopia..... 35
- Figura 3.** Pontos da aferição do pH. 41
- Figura 4.** Demonstração da aferição do pH 41
- Figura 5.** Amostras dos alimentos colhidos, representados antes da para posterior análise bromatológica. Observa-se em A: Concentrado peletizado + Pasto de estrela-roxa, propriedade 1 (Grupo Baixo Teor de Carboidratos Solúveis 1), B: Concentrado extruzado + Pasto de gramínea tifton 85, propriedade 2 (Grupo Baixo Teor de Carboidratos Solúveis 2), C: Concentrado farelado + Capim napier + Cana-de-açúcar, propriedade 3 (Grupo Alto Teor de Carboidratos Solúveis 1) e D: Concentrado farelado + Capim napier + Cana-de-açúcar, propriedade 4 (Grupo Alto Teor de Carboidratos Solúveis 2)..... 44
- Figura 6.** Gráfico de composição (membership) comparando GBTCS (Grupo Baixo Teor de Carboidratos Solúveis) versus GATCS (Grupo Alto Teor de Carboidratos Solúveis).
..... 54
- Figura 7.** Gráfico de estrutura (structure) comparando GBTCS (Grupo Baixo Teor de Carboidratos Solúveis) versus GATCS (Grupo Alto Teor de Carboidratos Solúveis) 55

Figura 8. Gráfico com a abundância relativa em relação aos fillos comparando GBTCS (Grupo Baixo Teor de Carboidratos Soluveis) versus GATCS (Grupo Alto Teor de Carboidratos Soluveis) 56

Figura 9. Gráfico com a abundância relativa em relação aos gêneros comparando GBTCS (Grupo Baixo Teor de Carboidratos Soluveis) versus GATCS (Grupo Alto Teor de Carboidratos Soluveis) 57

Figura 10. Análise Discriminante Linear (LDA Score) de Fillos que apresentaram diferença significativa ($LDA > 2$) comparando GBTCS (Grupo Baixo Teor de Carboidratos Soluveis) versus GATCS (Grupo Alto Teor de Carboidratos Soluveis) 58

Figura 11. Análise Discriminante Linear (LDA Score) de gêneros que apresentaram diferença significativa ($LDA > 2$) comparando GBTCS (Grupo Baixo Teor de Carboidratos Soluveis) versus GATCS (Grupo Alto Teor de Carboidratos Soluveis) 59

Figura 12. Distribuição individual dos animais nos GBTCS (Control) X GATCS (Sugar_cane)..... 60

Figura 13. Distribuição individual dos *animais* nos GBTCS (Control) X GATCS (Sugar_cane)..... 60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação de cárie periférica usando o sistema de Honma modificado.. 38

Quadro 2. Classificação de cárie infundibular usando o sistema de Honma modificado
..... 39

Quadro 3. Manejo alimentar do GATCS e GBTCS colhidos diretamente dos
responsáveis pelas propriedades de onde vieram..... 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição bromatológica dos alimentos utilizados.	46
Tabela 2. Avaliação da cárie periférica e infundibular na cavidade oral dos animais avaliados. São Paulo, SP, 2022. (n = 20)	48
Tabela 3. Avaliação do pH oral dos animais avaliados. São Paulo, SP, 2022. (n = 20)	50
Tabela 4. Avaliação da presença de diastema em válvula e na cavidade oral dos animais avaliados. São Paulo, SP, 2022. (n= 20)	51
Tabela 5. Avaliação dos índices de diversidade alfa. São Paulo, SP, 2022. (n = 20).....	53

1 INTRODUÇÃO

A saúde oral é de importância sistêmica para a saúde dos animais, e com o avanço da medicina veterinária e suas respectivas especialidades, a odontologia equina tem tido um destaque nos últimos anos. A pesquisa nessa área em equinos tem feito progressos consideráveis nos últimos 20 anos, proporcionando uma compreensão mais clara da epidemiologia das doenças que afetam a saúde bucal dessa espécie. Além disso, dentro da área, houve grandes avanços em relação às cirurgias bucomaxilares e da clínica odontológica em si, proporcionando melhores diagnósticos, estes mais precisos, aumentando as chances de sucesso dos tratamentos das doenças orais, e muitas vezes na capacidade de prevenção das mesmas.

A maioria das alterações dentárias, em equinos, possuem causas multifatoriais que vão desde de o tipo de dentição dessa espécie, como a fonte do alimento mastigado, a existência de processos dolorosos, o tempo de mastigação e as características físicas dos dentes, além da fisiologia mastigatória como um todo; e a associação de todos esses fatores, está diretamente relacionada às doenças odontológicas atulamente conhecidas, nessa espécie. Assim, os fatores supracitados podem incitar o aparecimento de alterações dentárias que, ao progredirem, são passíveis de provocar danos severos nos tecidos dentários e adjacentes ao dente, como o periodonto.

Como uma das multifatoriedades causadoras dessas alterações, temos a nutrição, a qual no decorrer dos anos, com a domesticação e maior confinamento dos animais, sofreu drástica mudança, uma vez que passou a ser essencialmente composta por alimentos concentrados, em detrimento de forragem. Contudo, quando olhamos para as características dos concentrados, estes possuem em sua maioria, uma concentração maior de nutrientes, fato que tem como consequência a diminuição do período de ingestão diário e alterações significativas quanto aos movimentos mastigatórios e tempo de ingestão do alimento, de forma que, no cavalo contemporâneo, a mandíbula passa a ter movimentos mais verticais e a exercer pouca excursão lateral.

Não somente a mecânica da mastigação está diretamente afetada nesse caso, mas também o menor tempo mastigatório com um volume de saliva menor. Além disso, quando são observadas as alternativas de fonte de volumosos, estas podem conter um teor elevado de carboidratos solúveis, os quais em consonância com os altos teores dos

mesmo presentes também no concentrado, podem ser fatores predisponentes para o aparecimento das cáries em equinos.

Em humanos, a cárie tem sido estudada há muitos anos e é bem estabelecida quanto fisiopatogenia da doença, assim como tratamentos e prevenções. No entanto, em cavalos, estudos semelhantes só foram publicados recentemente, e a elucidação quanto ao seu desenvolvimento e quanto ao microbioma bucal é recente. Dessa forma, este estudo visa verificar o perfil do microbioma bucal, pH oral, diastemas e o desenvolvimento de cáries periféricas e infundibulares em equinos alimentados com alto teor de carboidratos solúveis na dieta.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cáries periféricas e infundibulares

A cárie dentária é definida como uma desmineralização dos tecidos dentais inorgânicos calcificados, associada à destruição do seu componente orgânico (SOAMES; SOUTHAM, 2005; JACKSON et al., 2021). Tal desmineralização, ocorre pela presença de microrganismos orais, os quais possuem uma capacidade acidogênica que converte carboidratos rapidamente fermentáveis em ácidos e essa queda do pH oral, faz com que haja dano nos tecidos dentários (BARNETT, 2019; BORKENT et al., 2020). Em equinos, as cáries podem ser classificadas como infundibulares, localizadas nos infundíbulos dos dentes maxilares ou periféricas, localizadas no aspecto bucal, lingual e palatino dos dentes (DIXON, 2017; BORKENT et al., 2020).

A teoria Acidogênica, foi a primeira teoria a propor o envolvimento bacteriano no desenvolvimento da cárie dentária em humanos , na qual os carboidratos da dieta são fermentados por microorganismos orais em ácidos, principalmente ácido láctico, mas também ácido acético e propiônico. Estes ácidos causam uma queda no pH da placa dentária e quando ela diminui abaixo do nível crítico de 5,5, os íons minerais são liberados dos cristais de hidroxiapatita do esmalte, iniciando a cárie em humanos (MILLER, 1889). O mesmo ocorre nos cavalos, no entanto, a anatomia dentária faz com que o primeiro tecido a ser acometido, seja o cimento, seguido pelo esmalte e dentina, assim para o desenvolvimento da cárie periférica, o pH deve ser menos ácido, isto é, a um nível de pH de 6,7, enquanto o pH crítico na dentina é de cerca de 6,2 e enfim o esmalte de 5,5 (JACKSON et al., 2019). O efeito oposto também ocorre, isto é, os dentes tornam-se remineralizados quando o pH aumenta acima do valor crítico (SOAMES; SOUTHAM, 2005). No entanto, essas faixas de pH não são rígidas, porque o processo de desmineralização / remineralização também depende dos níveis de íons de hidroxila, fosfato e cálcio no fluido de placa e na saliva (DAWES, 2003). Quanto mais altos forem esses níveis de hidroxila, fosfato e cálcio no fluido ao redor dos dentes, menor foi o pH crítico. Como as concentrações desses íons na saliva e no fluido da placa podem variar entre os indivíduos, as faixas críticas de pH também podem variar de acordo com cada cavalo (DIXON, 2017).

Embora nos cavalos, os incisivos também tenham infundíbulos, a cárie infundibular é mais comum nos dentes maxilares superiores, os quais nessa espécie, são os únicos dentes os pré-molares e molares a terem infundíbulos, estes estando no aspecto rostral e caudal de cada dente, compondo dois infundíbulos por dente (JOHNSON, 2005). A presença de áreas de hipoplasia cementária nos infundíbulos parece predispor ao desenvolvimento de cáries infundibulares localizadas, além disso, também tem sido proposto que, quando áreas de cemento infundibular hipoplásico são expostas ao desgaste dental, alimentos e microorganismos orais acumulam nessa região e predispoem ao desenvolvimento de cáries infundibulares mais grave (BAKER, 1974; KILIC et al., 1997; SUSKE et al., 2016). Como complicação dessa afecção, podemos observar o desenvolvimento da infecção apical, caso ela se desenvolva através do esmalte infundibular, da dentina adjacente e da polpa ou a uma fratura patológica, mais frequentemente uma fratura designada sagital, ou seja, incluindo os infundíbulos relacionados à cárie (DIXON et al., 2014) como resultado do enfraquecimento mecânico associado a pontos de contato prematuros que podem receber resultantes de forças excessivas (DIXON, 2002; DACRE; KEMPSON; DIXON, 2007).

Já a cárie periférica envolve a destruição dos tecidos dentários presentes na coroa dos dentes, e são mais incidentes nas faces vestibulares. Podem ser causa de outras alterações dentárias significativas, incluindo desgaste prematuro e fraturas dentárias (JACKSON et al., 2021). A cárie periférica pode afetar todos os dentes, mas é muito rara em dentes caninos e menos comum nos incisivos (DIXON, 2017). Quando nos referimos aos dentes equinos, e, portanto, à sua anatomia única de animais com dentição hipsodonte, ou seja, possui uma relação maior de coroa em relação as raízes e um erupção continua ao longo da vida, além de possuírem uma justaposição dos dentes molares. Quando nessa região de justaposição, ocorre uma perda de cemento interproximal, causada por cárie periférica pode fisicamente predispor à formação de diastemas, os quais não são bem-vindos, por predispoem ao acúmulo de alimento e conseqüentemente fermentação do mesmo, causando halitose, proliferação bacteriana indesejável e o desenvolvimento da doença periodontal. Por outro lado, também foi sugerido que a doença periodontal causada por diastema pode levar a uma disbiose e, portanto, uma maior propensão para microorganismos cariogênicos no ambiente

adjacente (BARNETT, 2019), assim essa relação do que ocorre primeiro para o desenvolvimento da cárie periférica, ainda é controverso.

2.2 Dietas com alto teor de carboidratos solúveis

O cavalo evoluiu principalmente como um herbívoro pastando, fermentando o intestino posterior, com uma ampla gama de carboidratos forrageiros - hidrolisáveis a fermentáveis - como sua principal fonte de energia. Os carboidratos podem ser hidrolisados ou fermentados em cavalos, dependendo da ligação de suas moléculas de açúcar: carboidratos com moléculas ligadas a α -1,4 estão sujeitos a hidrólise enzimática, enquanto moléculas ligadas a β -1,4 devem ser fermentadas. Os carboidratos hidrolisáveis incluem hexoses, dissacarídeos, alguns oligossacarídeos (por exemplo, maltotriose) e amidos não resistentes à hidrólise enzimática. Os carboidratos fermentáveis incluem fibras solúveis (por exemplo, gomas, mucilagens, pectinas), alguns oligossacarídeos (por exemplo, frutanos, galactanos), amidos resistentes à hidrólise enzimática, hemicelulose, celulose e lignocelulose (HOLFFMAN, 2009).

As enzimas secretadas no intestino delgado específicas para a hidrólise de carboidratos incluem α -amilase, α -glicosidases (sucrase, glicoamilase, maltase) e β -galactosidase (lactase). Relativamente pouca α -amilase está presente na saliva equina, de modo que a hidrólise limitada ocorre antes da chegada dos carboidratos no estômago. No estômago, o ácido gástrico hidrolisa os carboidratos até certo ponto, independentemente das enzimas (HOLFFMAN, 2009).

As pastagens fornecem o principal habitat e nutrição para a maioria dos cavalos, e os demais cavalos confinados em baias têm pelo menos metade de sua nutrição fornecida por pastagens conservadas (HOLFFMAN, 2009). Com o confinamento do cavalo moderno, sua dieta tem sido complementada com concentrados de grãos para atender às demandas energéticas de desempenho. A experiência comum tem sido apoiada por estudos epidemiológicos e experimentais que associam os concentrados de grãos a vários distúrbios digestivos e metabólicos, incluindo cólica (Clarke et al., 1990; Hudson et al., 2001), laminite (Pass et al., 1998), úlceras (Murray, 1994), doença ortopédica do desenvolvimento (Kronfeld et al., 1990; Ralston, 1996), resistência à insulina (Hoffman et al., 2003a; Treiber et al., 2005) e algumas formas de rabdomiólise por esforço (Valentine et al., 2001).

Também recentemente a alimentação frequente de altos níveis de concentrados

em equinos é relacionador à predisposição ao desenvolvimento das afecções odontológicas, como o aparecimento das cáries periféricas (DIXON; DU TOIT; DACRE, 2010; JACKSON et al., 2021), o que é apoiado pela teoria acidogênica. Os cavalos alimentam-se por até 18 horas por dia, principalmente na forragem, e se tal forragem contiver carboidratos simples, como os frutanos, há um grande potencial para manter um pH crítico em sua cavidade oral por períodos prolongados, e assim ocasionar a desmineralização dos tecidos dentários (DIXON, 2017).

Outro agravante nas alterações dentárias que surgiram nos cavalos, foram as disponibilidades de volumosos, as quais apesar de o Brasil possuir um dos maiores rebanhos de equinos do mundo, o reduzido conhecimento relacionado ao manejo ideal desses animais é preocupante, em especial o manejo alimentar de cavalos estabulados. Grande parte dos equinos do Brasil recebem alimentação inadequada, desbalanceada e ausência de suplementação mineral (FIGUEIREDO et al., 1999; PIMENTEL et al., 2013; VIEIRA, 2015). Alguns desses alimentos, frequentes na dieta de equinos, são as silagens e forragens com alto teor de açúcares, como é o caso da cana-de-açúcar, obtendo cada vez mais adeptos como alternativa na alimentação volumosa dos cavalos, principalmente pelo seu baixo custo (FURTADO; BRANDI; RIBEIRO, 2011). No mundo, o Brasil atualmente é o maior produtor de cana de açúcar, possui área cultivada de aproximadamente 5,5 milhões de hectare. Somente para alimentação animal, estima-se que 10% da produção total seja utilizada para este fim. Tendo em vista esse cenário, torna-se cada vez mais comum sua preferência, principalmente pelas características de facilidade de cultivo, possível colheita na época de estiagem, fácil armazenamento ou conservação a campo, facilidade de produção em nossas condições climáticas (LANDELL, 2002).

Porém, o teor de açúcar presente em sua composição bromatológica representa

de 40% a 50% da matéria seca, o que está diretamente ligado ao seu valor nutricional. Além disso, possui média de 3,08% de proteína bruta, caracterizando-a como um alimento de baixo teor de proteína, o que a classifica como um alimento nutricionalmente desbalanceado, quando oferecida como dieta única, com baixa capacidade de preenchimento das necessidades de manutenção animal (THIAGO; VIEIRA, 2002; FURTADO; BRANDI; RIBEIRO, 2011). Por outro lado, sobre aspecto de conservação de forragem, após ser cortada, a cana-de-açúcar pode ser armazenada por até três dias, contudo, em sua forma picada deve ser utilizada de imediato, para dessa forma evitar os efeitos negativos da fermentação sobre o seu consumo (THIAGO; VIEIRA, 2002).

2.3 Composição e produção de saliva

As glândulas salivares de equinos compreendem três pares de glândulas bem definidas e glândulas menores (lóbulo dispersos de tecido salivar). As principais glândulas salivares são a parótida, a mandibular e a sublingual. As glândulas salivares menores incluem a labial, a bucal, lingual e a palatina (FRANDSON; WILKE; FAILS, 2009). Os nervos parassimpáticos constituem a inervação eferente dos reflexos neurais que regulam a secreção salivar. Os fatores que estimulam a secreção salivar incluem a visão e o sabor do alimento, a presença de alimento na cavidade oral e os reflexos condicionados (FRANDSON; WILKE; FAILS, 2009).

A saliva consiste de água, eletrólitos, muco e enzimas. A água e o muco suavizam e lubrificam a ingesta para facilitar a mastigação e a deglutição. A secreção salivar, assim como outras secreções digestivas, contém várias enzimas hidrolíticas destinadas a promoverem, mediante sua atividade catalítica, a degradação dos componentes alimentares, tornando-os adequados à absorção intestinal. As enzimas mais abundantes da secreção salivar são a alfaamilase e a lisozima. A amilase atua digerindo o amido e está presente na saliva de onívoros, em grau limitado em cavalos, mas ausente em ruminantes e carnívoros. A lisozima é uma enzima com ação antibacteriana. (FRANDSON; WILKE; FAILS, 2009) .

O primeiro estudo dos fatores que influenciam o fluxo salivar em equinos, foi realizado através da canulação da glândula parótida por Colin 1886, e mostrou que a produção de saliva em cavalos só acontecia quando havia movimento mastigatório. Posteriormente descobriu-se que o primeiro fluxo salivar acontece mais especificamente

após 10 a 20 movimentos mastigatórios (SCHEUNERT & TRAUTMAN, 1921).

Cavalos produzem 40-90 ml de saliva por minuto, pôneis 20-60 ml. A produção pode chegar a 100 litros por dia em um cavalo de porte médio (LEWIS, 2000). A produção varia também com o tipo de alimento. Por quilo de material fibroso é produzida muito mais saliva que por quilo de concentrado. A saliva dos equinos contém pouca enzimas digestivas, sendo seus constituintes mais expressivos minerais e bicarbonato, que provavelmente servem para uma neutralização dos ácidos formados na porção inicial do estômago. A saliva possibilita a deglutição e umedece o alimento de maneira que os sucos gástricos formados no estômago possam penetrar no bolo alimentar (MEYER, 1995).

No geral, os animais passam menos tempo no pasto e são alimentados cada vez mais com “alimentação multifuncional” (pastagem, feno, concentrado), o que reduziu o tempo de mastigação e a produção salivar quando comparado ao passado da criação dessa espécie (LUNDSTRÖM et al., 2021). Assim, houve um aumento na procura, estudo e demanda de cavalos na área da odontologia equina, o que tornou-se algumas afecções mais bem conhecidas e diagnosticadas na cavidade oral desses animais. A cárie periférica é um

exemplo dessas afecções e seu desenvolvimento acredita-se ser parecido com o que ocorre nos humanos (LUNDSTRÖM et al., 2007).

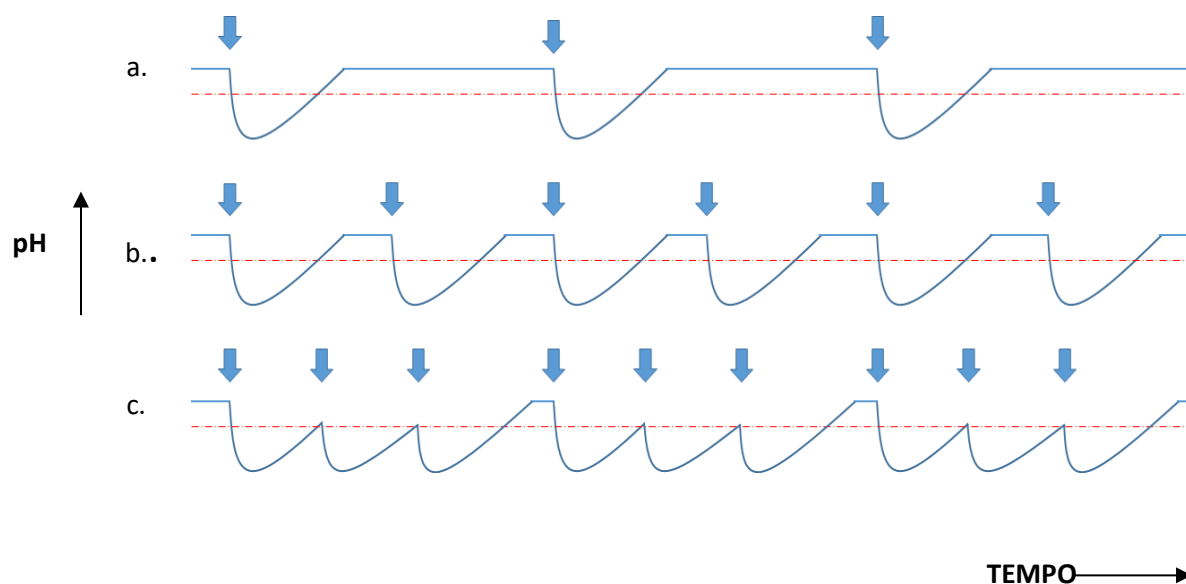
Sendo assim, sabe-se que o fluxo e a composição da saliva são importantes para o mecanismo de proteção da cárie em equinos (LENANDER-LUMIKARI M & LOIMARANTA, 2000; STOOKEY, 2008). Por exemplo um tempo de mastigação reduzido, resulta em menor salivação e mudanças na composição da saliva, e assim provavelmente aumenta o risco de cárie dentária em cavalos (LUNDSTRÖM et al., 2021).

2.4 pH e biofilme da placa bacteriana

Quando os ácidos provenientes da fermentação de carboidratos solúveis da dieta são formados, o pH inicial na placa bacteriana que cobre os dentes que sofrem de cáries é menor e, portanto, o pH permanecerá abaixo do nível crítico por um período maior do que o que ocorre com o mesmo cenário em dentes saudáveis (SOAMES; SOUTHAM, 2005; DIXON, 2017). A frequência de ingestão de carboidratos rapidamente fermentáveis é importante no ciclo de pH da placa, ou seja, quanto mais frequente os carboidratos fermentáveis forem ingeridos, mais tempo a placa estará abaixo do pH crítico e, assim, resultará em uma inclinação do equilíbrio entre a desmineralização e a remineralização em direção à desmineralização (TEN CATE, 2015), essa atividade tem sido bem descrita em humanos, supõe-se que o mesmo ocorra na espécie equina (figura 1).

Figura 1. Ciclagem de pH na placa dentária humana dependente da frequência da ingestão de carboidratos fermentáveis: (a) comer três vezes ao dia; (b) comer seis vezes ao dia e (c) comer nove vezes ao dia. As setas indicam o tempo de ingestão de alimentos. As linhas vermelhas quebradas representam o pH crítico sob o qual ocorre a desmineralização e acima do qual pode

ocorrer a remineralização



Fonte: Adaptado de (TEN CATE, 2015; DIXON, 2017).

Em humanos, dentro de um aspecto normal, há uma dinâmica de produção de um biofilme, o qual faz parte da fisiologia bucal equina. Esse biofilme fino normal aderido à superfície dos dentes é denominado de película (película adquirida), porém se esse biofilme se torna muito espesso e de composição anormal, é denominado placa, cuja presença é um dos pré-requisitos para o desenvolvimento da cárie (DIXON, 2017). A formação normal da película começa dentro de segundos após um dente ser exposto à saliva e desempenha um papel importante na lubrificação oral, na regulação da homeostase mineral e na defesa do hospedeiro (SIQUERA et al., 2013). Essa película é uma camada fina (0,5-1 μm), em grande parte proteica, contendo alguns carboidratos e lipídios que se formam na superfície dos dentes normais. As fontes destes compostos são secreções salivares, fluido gengival, células epiteliais orais e produtos microbianos orais (HANNIG; JOINER 2006; SIQUERA et al., 2013). As bactérias podem aderir à película adquirida dentro de três minutos da exposição dos dentes à saliva (HANNIG et al., 2007) e as proteínas na película têm receptores específicos para adesinas bacterianas que facilitam este processo (HANNIG et al., 2007).

A formação dessa placa bacteriana é então um biofilme anormal e espesso que

consiste principalmente de uma matriz orgânica de mucinas salivares (mucopolissacarídeos, os principais componentes glicoproteicos do muco) e polímeros polissacarídicos extracelulares com microrganismos aderentes (SOAMES; SOUTHAM, 2005). À medida que o biofilme da placa amadurece, sua comunidade microbiana se torna mais complexa, e a taxa de crescimento da placa dental depende da disponibilidade de nutrientes, da competição com outros microrganismos e das condições ambientais dentro do biofilme (CHÁVEZ DE PAZ; HAMILTON; SVENSÄTER, 2008). Os locais de predileção para a placa se acumular incluem áreas mecanicamente protegidas (BUCHALLA, 2013) e isso também parece ser o caso em cavalos, uma vez que a placa é frequentemente encontrada em diastemas de dentes molares (COX; DIXON; SMITH, 2012; JACKSON., 2021).

2.5 Microbiota da cavidade oral

Em uma cavidade oral normal de animais, a microbiota natural é bastante diversificada, composta de diversas classes de microrganismos, e dentre elas as bactérias ganham especial atenção, como por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans* (HIRSH; ZEE, 2003; BRAGA et al., 2005; QUINN et al., 2005; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Estes microorganismos podem viver harmonicamente na mucosa oral dos animais, como também podem causar lesões como úlceras, gengivites, formação de placas e cálculos dentários, cáries e periodontite (DIDRY et al., 1998; KARPINSKI; SZKARADKIEWICZ, 2013).

No entanto, aproximadamente 50% do microbiota oral possui cultivo desafiador, impedindo muitas vezes a identificação de grande parte das bactérias, dessa forma, muitas delas não caracterizadas anteriormente foram identificadas na periodontite humana por meio de técnicas moleculares modernas (SANTOS, 2014), o mesmo ocorreu em trabalhos recentes em cavalos, mas o assunto ainda é pouco explorado na literatura (BORKENT et al., 2020). Os métodos independentes de cultivo, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento de nova geração são exemplos de técnicas capazes de fornecer esse tipo de informação (SANTOS, 2014).

Embora a cavidade oral de animais seja distinta da do homem, o mesmo possui uma microbiota bastante complexa constituída por bactérias, leveduras, protozoários e alguns vírus (LOESCHE, 1997; MARSH; MARTIN, 1999; KIANOUSH et al., 2014). Contudo, mesmo nos animais, a microbiota residente não é a mesma nas diversas espécies animais, devido a diferenças fisiológicas e anatômicas existentes entre elas (SAVAGE, 1977; TANNOCK, 1988; VETROVSKY; BALDRIAN, 2014).

Santos (2014), em seu estudo com equinos, encontrou que na superfície oclusal, o micro-organismo mais prevalente foi o *Staphylococcus* spp. em 81,25% das amostras, enquanto que no terço médio da língua, o mais prevalente foi *Streptococcus* spp. em 62,5% das amostras. Além disso ele sugeriu que a associação bacteriana mais frequente, tanto na superfície oclusal quanto no terço médio da língua, foi *Staphylococcus* spp. com *Streptococcus* spp., encontrados em 18 e 12 das 48 amostras de cada local respectivo. E a segunda associação mais encontrada foi de *Staphylococcus* spp. com *Nocardia* spp., encontrados em 6 das 48 amostras tanto da mesa dentária quanto do terço médio da língua. Embora utilizado uma técnica de cultivo, a qual sabemos hoje que possui limitações para o traçado de perfil microbiótico haja em vista que vários microrganismos não crescem facilmente nessa forma de avaliação, foi um começo do que se pode encontrar com frequência na cavidade oral de equinos.

Podemos perceber que ainda há poucos trabalhos sobre as bactérias envolvidas na cárie dentária equina, e a maioria dos estudos bacteriológicos convencionais em humanos revelou a presença de uma espécie bacteriana bem característica na cárie infundibular de dentes maxilares, o *Streptococcus devriesei*. (LUNDSTRÖM; DAHLEN; WATTLE, 2007). Em trabalhos mais recentes, os quais utilizaram a técnica de sequenciamento de nova geração encontrou um perfil da microbiota oral de cavalos acometidos com doença periodontal, os quais os microrganismos mais associados a doença foram as espécies *Prevotella* e *Veillonella*, enquanto em animais saudáveis as espécies *Gemella* e *Actinobacillus* parecem ter maior relação (KENNEDY et al., 2016). Quando o mesmo foi feito para animais com cáries, a espécie mais relacionada foi *Streptococcus* e em animais saudáveis a *Gemella*, no entanto quando comparou-se o perfil da microbiota dos dentes rostrais e caudais dos animais acometidos pela doença cariosa em relação aos saudáveis, as espécies as quais parecem estar mais associadas

são respectivamente *Veillonella*, *Streptococcus* e *Corynebacterium* (BORKENT et al., 2020).

Uma relação causal entre *Streptococcus mutans* e cárie foi estabelecida em experimentos com ratos gnotobióticos, ou seja, livre de germes patogênicos específicos (FITZGERALD et al., 1960; GIBBONS et al., 1966) e hamsters convencionais (KEYES, 1960; FITZGERALD; KEYES, 1960). Esses animais desenvolveram cáries após a exposição a espécies ativas de cárie (KEYES, 1960) ou após seus dentes terem sido inoculados com “estreptococos indutores de cárie” (FITZGERALD; KEYES, 1960), a maioria dos quais se encaixa na descrição de *S. mutans* (GUGGENHEIM, 1968; EDWARDSSON, 1968). Após estes estudos, a cárie foi classificada como uma doença infecciosa transmissível, com o *S. mutans* como o patógeno mais importante em equinos (DIXON, 2015).

Na hipótese da “placa específica” em humanos, microrganismos patogênicos específicos são causadores das cáries, acredita-se inicialmente que os *Lactobacillus spp.* sejam as bactérias mais importantes no desenvolvimento de cárie devido às suas características acidogênicas, o que significa que eles podem produzir ácido e sobreviver em um ambiente ácido (KLIGLER; GIES, 1915; TAKAHASHI; NYVAD, 2011) proposta também sugerida em equinos (DIXON, 2015), microrganismo esse, que foi o único que diferiu em cavalos quando comparou-se o biofilme de animais com cáries e saudáveis (DIXON et al., 2020).

Segundo Gross et al., 2012, essas informações estão bem descritas em humanos, o que possibilita crer que um processo similar em equinos ocorra, ou seja, a presença abundante de *Lactobacillus spp.* no biofilme, está intimamente correlacionado com um pH desse biofilme mais ácido. Esse processo ocorre pela fermentação de carboidratos solúveis prévia de outros microrganismos, como os *Streptococcus*, e assim a possibilidade da ativação metabólica dos *Lactobacillus*. Estes são responsáveis pela cavitação dos tecidos dentários, e, portanto, uma cárie em seu grau mais avançado.

Dessa forma, como cerca de 50% das bactérias orais são difíceis de serem cultivadas convencionalmente (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2013), a bacteriologia molecular da cavidade oral equina em cavalos controle e afetados por cárie precisa ser melhor elucidada, por exemplo, usando Sequenciamento de Nova Geração [NGS] de bactérias

por meio da identificação e amplificação do gene 16S rRNA (BORKENT et al., 2020).

3 HIPÓTESE

Cavalos alimentados com volumoso à base de cana de açúcar, portanto, com alto teor de carboidratos solúveis, além de concentrado com alto amido apresentam maior quantidade de cáries periféricas e infundibulares, alterações no pH da cavidade oral e perfil microbiológico, quando comparados com equinos alimentados à pasto, com gramínea *Cynodon* spp e concentrado com baixo amido.

4 OBJETIVO

Avaliar a incidência de cáries periféricas, infundibulares, diastemas, pH da cavidade oral e perfil microbiológico bucal de cavalos alimentados com volumosos e concentrado com alto teores de carboidratos solúveis em comparação com os alimentados com volumoso e concentrado com baixo teor de carboidratos solúveis.

4.1 Objetivos específicos

- Avaliar a composição bromatológica de alimentos de alto e baixo teor de carboidrato solúvel;
- Avaliar a ocorrência da cárie periférica de equinos alimentados com volumosos de alto teor de carboidrato solúvel, e os alimentados com volumoso de gramínea *Cynodon* spp.;
- Avaliar a ocorrência da cárie infundibular de equinos alimentados com volumosos de alto teor de carboidrato solúvel, e os alimentados com volumoso de gramínea *Cynodon* spp.;
- Avaliar a presença e tipo de diastema de equinos alimentados com volumosos de alto teor de carboidrato solúvel, e os alimentados com volumoso de gramínea *Cynodon* spp.;
- Mensurar o pH da cavidade oral de equinos alimentados com volumosos de alto teor de carboidrato solúvel, e os alimentados com volumoso de gramínea *Cynodon* spp.
- Avaliar o perfil do microbioma oral de equinos alimentados com volumosos de alto teor de carboidrato solúvel, e os alimentados com volumoso de gramínea *Cynodon* spp.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FZEA/USP e possui o protocolo CEUA nº 1167131219.

5.1 Local e animais

O estudo foi desenvolvido nas dependências do Setor de Clínica e Cirurgia de Equinos, da Unidade Didática Clínico Hospitalar (UDCH), da FZEA/USP, em parceria com o Centro de Apoio ao Ensino e Pesquisa (CAEP), no Centro de Odontologia Equina (COE) da FMVZ/USP, em Pirassununga - SP. Foram selecionados 20 animais, machos e fêmeas, hípidos, com faixa etária média de 7,5 anos, com peso corpóreo entre $473 \pm 34,75$ kg, sem raça definida, com a mesma dieta a pelo menos 3 anos, distribuídos em dois grupos experimentais, sendo eles: Grupo Alto Teor de Carboidratos Solúveis (GATCS) composto por 10 equinos, os quais foram selecionados quanto à fonte de alimentação volumosa a base de cana de açúcar, e com uma fonte de concentrado com altos teores de carboidratos solúveis e, Grupo Baixo Teor de Carboidratos Solúveis (GBTCS), composto por 10 equinos, os quais foram selecionados por possuírem histórico de alimentação volumosa a base de gramínea *Cynodon spp*, e concentrado comercial com baixo teores de carboidratos solúveis.

5.2 Exclusão dos animais

Foram realizados em todos os animais exames clínicos (frequência cardíaca, frequência respiratória, motilidade intestinal, temperatura retal (°C), TPC (tempo de preenchimento capilar da mucosa oral) e exames laboratoriais (hemograma, função renal e hepática). Assim foi adotado como critério de exclusão, alterações nesses exames que configurassem a não higidez do animal, que representaria risco ao procedimento anestésico ao qual o animal seria submetido.

Animais os quais não pertenciam ao manejo alimentar descrito acima, idade ou

alterações odontológicas que pudesse interferir no resultado final do estudo, foram utilizados como critério de exclusão.

5.3 Histórico alimentar dos animais

O histórico alimentar dos animais foi colhido via entrevista com os responsáveis pelo manejo dos mesmos, quanto à fonte de volumoso, concentrado, sal mineral e suas respectivas quantidades fornecidas em 24 horas, todos os animais possuíam o mesmo manejo alimentar há pelo menos 3 anos.

. Para tanto, o GATCS advieram de duas propriedades distintas, os animais possuíam estabulação em piquetes, os mesmos sem pastejo, e o volumoso era fornecido duas vezes ao dias, assim como o concentrado comercial, o sal mineral era fornecido somente em uma das propriedades de forma ad libitum.

Para o GBTCS, os mesmos também advieram de duas propriedades distintas, porém com manejos semelhantes, afim de padronizar ao máximos todos os grupos do estudo. Os animais possuíam estabulação em piquetes, no entanto diferentemente do GATCS, os mesmos possuíam pasto, os quais no GBTCS1 possuíam como fonte de volumoso pasto de gramínea- estrela- roxa (*Poaceae*), *Cynodon L. C. Rich* e o GBTCS 2, pasto de gramínea Tifton 85, *Cynodon sp*, melhor ilustrado no quadro 1.

Também, na figura 5, apresentam- se os alimentos coletados para envio à análise bromatológica., e posteriormente, a tabela 1 descreve a composição bromatológica de todos os alimentos utilizados.

Quadro 1. Manejo alimentar do GATCS e GBTCS colhidos diretamente dos responsáveis pelas propriedades de onde vieram.

Grupo	Concentrado	Volumoso 1	Volumoso 2	Sal Mineral
Grupo Baixo Teor de Carboidratos Soluveis 1 GBTCS (5 animais)	SUSTANCE 12 RAÇÕES FAZENDEIRO- 1 kg uma vez ao dia.	Pasto de gramínea- estrela- roxa (<i>Poaceae</i>), <i>Cynodon L. C. Rich</i> .	Ausente.	SUSTANCE MINERAL- RAÇÕES FAZENDEIRO Ad libitum.
Grupo Baixo Teor de Carboidratos Soluveis 2 GBTCS (5 animais)	PROEQUI 13 - 1kg uma vez ao dia.	Pasto de gramínea- tifton 85. (<i>Cynodon sp.</i>)	Ausente.	CENTAURO 80 GUABi. Ad libitum.

Grupo Alto Teor de Carboidratos Soluveis 1 GATCS (5 animais)	4 kg quirera de milho com aveia duas vezes ao dia.	5 kg Cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i>) picada duas vezes ao dia.	5 kg de Capim Napier (<i>Pennisetum purpureum</i>), picado duas vezes ao dia.	QUALY PHÓS EQUINOS. Ad libitum.
Grupo Alto Teor de Carboidratos Soluveis 2 GATCS (5 animais)	4 kg quirera de milho com aveia duas vezes ao dia.	5 kg Cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i>) picada duas vezes ao dia.	5 kg de Capim Napier (<i>Pennisetum purpureum</i>), picado duas vezes ao dia.	Ausente.

Fonte: Acervo pessoal.

Figura 1. Amostras dos alimentos colhidos, representados para análise bromatológica. Observe-se em A: Concentrado peletizado + Pasto de estrela-roxa, propriedade 1 (Grupo Baixo Teor de Carboidratos Soluveis 1), B: Concentrado multiparticularizado + Pasto de gramínea tifton 85, propriedade 2 (Grupo Baixo Teor de Carboidratos Soluveis 2), C: Concentrado farelado + Capim napier + Cana-de-açúcar, propriedade 3 (Grupo Alto Teor de Carboidratos Soluveis 1) e D: Concentrado farelado + Capim napier + Cana-de-açúcar, propriedade 4 (Grupo Alto Teor de Carboidratos Soluveis 2).



Fonte: Acervo pessoal.

5.4 Análise bromatológica dos alimentos

Para coleta das amostras das forragens (estrela roxa e tifton 85), foi demarcada a área amostrada no piquete do animais, coletado de 15 a 20 sub-amostras, abrangendo toda a área amostrada, nas regiões as quais a parte superior da vegetação, que correspondeu a 50 % da altura do pasto, foram cortadas. O corte foi realizado com tesoura própria e as sub-amostras foram misturadas até tornar-se uma única amostra homogênea, e após retirar aproximadamente 1 kg representativo dessa amostra, esta foi armazenada em em sacos plásticos e congelada até o dia da realização da composição bromatológica (GENRO; ORQIS, 2008). Para as amostras de cana-de-açúcar e capim napier, as mesmas foram picadas em um picador forrageiro 1,5CV CID-75P, Rotor com 2 Facas. Para a coleta das amostras dos concentrados, foram coletadas sub-amostras representativas das rações das propriedades e, posteriormente, essas foram misturadas para se tornarem uma amostra única, com quantidade aproximada de 1 kg, as quais, foram armazenadas em sacos plásticos e congeladas até o dia da realização da composição bromatológica (GENRO & ORQIS, 2008).

As amostras colhidas foram então desidratadas em estufa de ventilação forçada, submetidas a 55°C durante 72 horas, para peso constante com moagem subsequente (tipo Willey moinhos com peneira de 1 mm). O teor de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), cinza (MM) e extrato etéreo (EE) foram avaliados de acordo com AOAC (2005). Fibra detergente neutra (FDN) e ácido (FDA) foram determinados pelo método de particionamento de fibras proposto por Silva e Queiroz (2005). O teor de amido foi determinado pelo método enzimático descrito por Hendrix (1993). Os teores de carboidratos solúveis foram determinados pela técnica descrita por Silva e Queiroz (2005), a qual determina os carboidratos solúveis em água por meio da espectrofotometria, realizada após a formação de um complexo azulesverdeado, gerado pelo aquecimento desses compostos em solução de antrona fortemente ácida. Estas análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e realizada repetição quando o coeficiente de variação entre as amostras foram maior do que 5,0% (Tabela 1).

Tabela 1. Composição bromatológica dos alimentos utilizados.

Amostras	Grupo Experimental	Matéria seca (%)	Matéria mineral (%)	Proteína bruta (%)	Fibra em detergente ácido (%)	Fibra em detergente neutro (%)	Extrato etéreo (%)	Amido (%)	Carboidratos Solúveis (%)
VOLUMOSOS									
Cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	GATCS 1	30,96	3,04	1,62	43,21	57,91	0,94	10,49	35,9
Napier (<i>Pennisetum purpureum</i>)	GATCS 1	17,07	6,69	3,04	55,15	78,20	1,71	5,32	6,5
Cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	GATCS 2	32,82	3,23	2,30	32,78	44,55	0,90	18,42	27,31
Napier (<i>Pennisetum purpureum</i>)	GATCS 2	16,35	4,61	2,81	63,89	80,16	0,95	5,82	4,2
Estrela-roxa (<i>Poaceae</i>), (<i>Cynodon L. C. Rich</i>)	GBTCS 1	33,45	7,41	13,19	46,59	73,98	1,68	3,67	7,51
Tifton 85 (<i>Cynodon spp.</i>)	GBTCS 2	17,34	7,36	10,83	45,16	79,76	2,11	1,27	5,55
CONCENTRADOS									
Ração farelada caseira	GATCS 1	86,21	1,78	11,31	9,62	19,40	3,81	83,53	3,75
Ração farelada caseira	GATCS 2	86,22	1,64	11,08	8,24	17,29	3,34	82,50	5,29
Sustance 12 Rações fazendeiro	GBTCS 1	90,09	6,90	11,96	16,30	39,00	3,90	25,33	4,88
Proequi 13 Laminados	GBTCS 2	88,43	12,43	13,61	16,98	39,12	3,90	17,31	5,98

Fonte: Acervo pessoal.

5.5 Avaliação da cárie periférica e infundibular na cavidade oral

Para avaliação da cavidade oral quanto à presença de cáries periférica e infundibular, os animais foram contidos em tronco de contenção próprio para cavalos e foi realizada a inspeção do animal com a cavidade oral fechada, para a avaliação da simetria entre os músculos temporais, cristas faciais e movimentos rostro-caudais e latero-laterais, com palpação externa da arcada dentária.

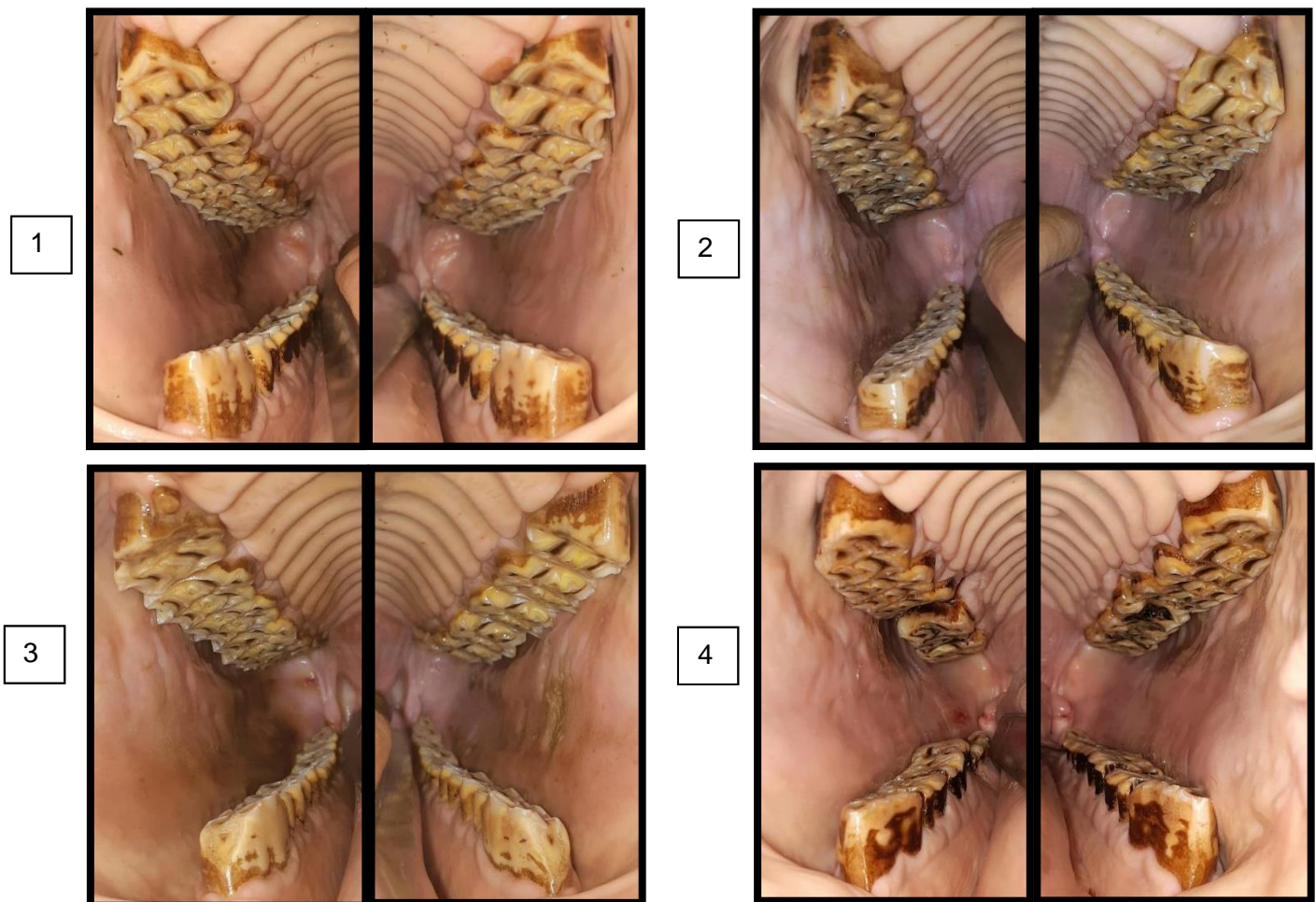
Juntamente com a coleta de dados para o experimento em questão, foi realizado um estudo paralelo, para avaliação da qualidade de sedação dos animais, os quais foram divididos, aleatoriamente, em grupo bolus e grupo infusão. Foi realizada tricotomia da região de jugular no pescoço, seguida de antissepsia e posterior introdução de cateter 14G, com torneira de três vias acoplada, fixados com adesivo a base de cianoacrilato, para futura administração dos fármacos sedativos. Foi administrado 0,05 mg/kg, via intravenosa (IV), de acepromazina, nos equinos de ambos os grupos experimentais. Após 30 minutos, os equinos do grupo bólus (GB, n = 10), receberam detomidina 20 µg/kg/IV, e os equinos do grupo infusão (GI, n = 10), receberam detomidina 20 µg/kg/IV, seguida de infusão contínua de 20 µg/kg/h. Avaliação comportamental, abrangendo movimentos mastigatórios, linguais, de cabeça e reposta ao estímulo oral com água, foi periodicamente graduada e, quando classificada como insuficiente, foi complementada com bólus de butorfanol (7 µg/kg/IV), no GB ou bólus (7 µg/kg/IV), seguido de infusão contínua (7 µg/kg/h/IV), no GI. Em ambos os grupos, quando julgado necessário, demais

suplementações de sedação foram realizadas com detomidina (7 µg/kg/IV) e butorfanol (7 µg/kg/IV).

Com os equinos sedados, foi realizada abertura da cavidade oral com auxílio de espéculo oral e foram avaliadas individualmente as lesões presentes, quanto à presença de cáries periféricas e infundibulares. Além disso, foram descritas as alterações oclusais presentes. A avaliação foi realizada com auxílio de oroscópio oral adaptado para equinos, para isso, foi utilizado um endoscópio rígido de 40-70 cm de comprimento, com ângulo ótico de 50 a 90°. A documentação dos achados também foi realizada por meio de fotografias (figura 2).

As cáries foram avaliadas quanto ao tipo, sendo elas, cárie periférica ou cárie infundibular e quanto ao seu grau, variando de 0 a 4, de acordo com suas características, conforme disposto por Dacre (2005) nos quadros 1 e 2.

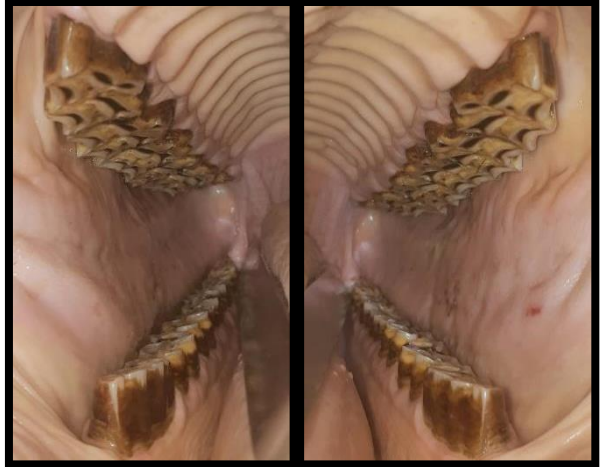
Figura 2. Imagens por meio de oroscopia, realizada após sedação, no primeiro contato com a cavidade oral. Animais do GATCS, representadas de 1 a 10 e GBTCS, de 11 a 20.



5



6



7



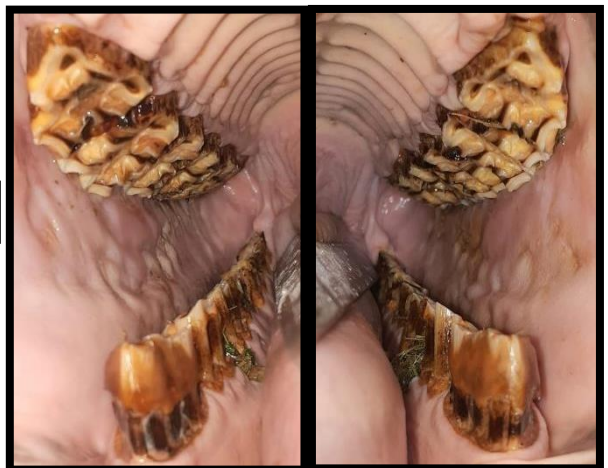
8



9



10



11



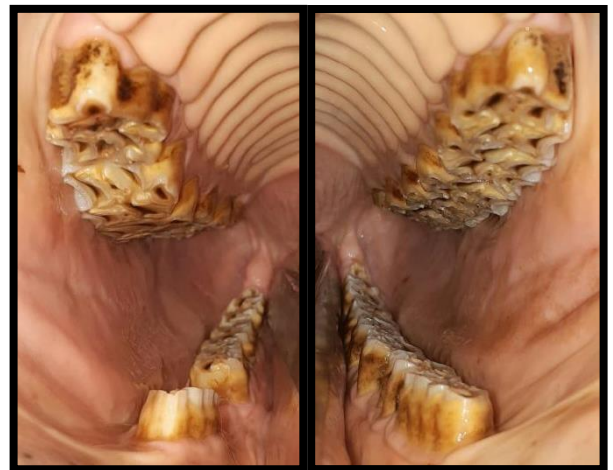
12



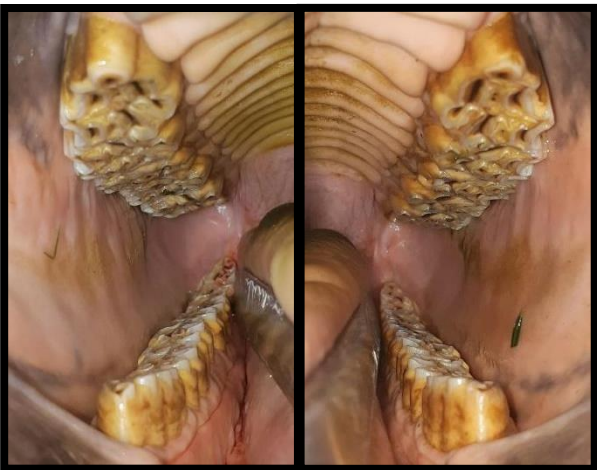
13



14



15



16



17



18



19



20



Quadro 2. Classificação de cárie periférica usando o sistema de Honma modificado.

Grau da Cárie Periférica	Descrição das lesões nos tecidos dentários
Grau 0	Dente normal, isto é, sem cárie periférica macroscópica visível.
Grau 1. Classe 1	Apenas cimento afetado: As lesões aparecem como pontos de erosões superficiais ou focais.
Grau 1. Classe 2	Apenas cimento afetado: Lesões mais severas com cimento completamente perdido em algumas áreas, expondo o esmalte subjacente (mas grosseiramente não afetado).
Grau 2	Lesões afetando o cimento e esmalte adjacentes.
Grau 3	Lesões afetando cimento, esmalte e dentina.

Grau 4	Lesões causando a perda da integridade do dente (fraturas secundárias e/ou infecção apical).
--------	--

Fonte: (DACRE, 2005).

Quadro 3. Classificação de cárie infundibular usando o sistema de Honma modificado.

Grau da Cárie Infundibular	Descrição das lesões nos tecidos dentários
Grau 0	Dente normal, isto é, sem cárie infundibular macroscópica visível; um pequeno defeito central (canal vascular) na superfície oclusal dos infundíbulos é considerado normal.
Grau 1	Apenas cemento afetado.
Grau 2	Lesões afetando o cemento e esmalte adjacentes.
Grau 3	Lesões afetando cemento, esmalte e dentina.
Grau 4	Lesões causando a perda da integridade do dente (fraturas secundárias e/ou infecção apical).

Fonte: (DACRE, 2005).

5.6 Microbiota da cavidade oral

As coletas foram realizadas por meio de suabes estéreis da face oclusal dos dentes maxilares, em sua face palatina, vestibular e oclusal nos animais do GBTCS e nos animais do GATCS. As amostras colhidas foram acondicionadas em tubos estéreis próprios dos suabes, vedados e armazenados em uma temperatura a -80°C.

O DNA foi extraído no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) no Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Campus de Jaboticabal, e essa extração ocorreu a partir de um kit comercial QIAamp PowerFecal DNA Kit (Qiagen)®. A amplificação por PCR foi feita utilizando os oligonucleotídeos iniciadores F515 e R806 para a região V4 do gene 16S rRNA (CAPORASO et al., 2011). Os primers, tanto forward como o reverse, foram projetados contendo uma região de sobreposição de sequenciamento Illumina, a fim de

serem reconhecidos como primers com adaptadores Illumina com mais de 8 pares de base nos índices de identificação (COSTA; WEESE, 2015).

A amplificação foi submetida às seguintes condições de PCR: 3 min a 95 °C para desnaturação, e 35 ciclos de 30 s a 95 °C para desnaturação, 90 s a 55 °C para emparelhamento e 30 s a 72 °C para alongamento seguido por um período final de 5 min a 72 °C e mantido a 4 °C até purificação.

Os produtos de PCR foram purificados em três etapas, sendo as duas primeiras segundo o protocolo 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation da Illumina e a terceira, a partir do gel de agarose 2% com o kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit Supplied with capped columns (Zymo Research®), de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, foi realizada a quantificação das amostras/bibliotecas utilizando o Qubit Assay kit de acordo com as recomendações do fabricante. As bibliotecas purificadas e quantificadas foram misturadas de maneira equimolar e sequenciadas (2x150pb) com o MiSeq® Reagent Kit v2 (300 ciclos) de acordo com as especificações do fabricante, utilizando-se a plataforma Illumina.

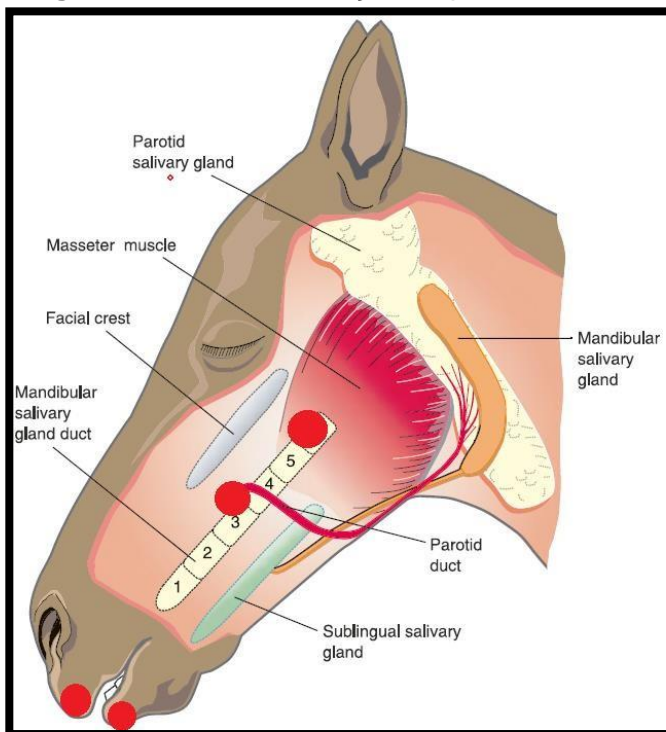
A análise de bioinformática foi realizada usando o Mothur (versão 1.31.2) seguindo o MiSeq SOP, que foi acessado em setembro de 2021. Resumidamente, arquivos originais fastq foram montados em contigs excluindo as sequências maiores que 325 pb de comprimento, as que tinham ambiguidade nos pares de bases e também as que tinham polímeros maiores que 8 pb. As sequências foram alinhadas usando o banco de dados de referência de rRNA SILVA 16S. Quimeras foram identificadas e removidas. Sequências foram então agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) pertencentes ao mesmo gênero. A classificação taxonômica foi obtida do banco de dados RDP (Ribosomal Database Project). Leituras classificadas como o mesmo gênero foram agrupadas em filotipos. Foram utilizadas 51.645 leituras por amostra.

5.7 Avaliação do pH da cavidade oral

De cada animal, em ambos os grupos experimentais, foram realizadas as colheita das amostras de pH diretamente sobre a mucosa oral nos determinados pontos: área média do lábio superior, área média do lábio inferior, mucosa vestibular na altura entre

os dentes 108/109 e 208/209, local na qual há a saída da glândula parótida (figura 3). O pH foi aferido antes de qualquer manipulação na cavidade oral, por meio de pHmetro portátil modelo AK90, com faixa de medição entre pH: 0.0 a 14.0 (medidor pH AKSO), o qual era calibrado em soluções de calibração (pH4, pH7 e pH10), antes de cada avaliação e armazenado em solução de armazenamento (KCl) (figura 4).

Figura 3. Pontos da aferição do pH.



Fonte: Imagem adaptada de (BAKER; EASLEY 1999).

Figura 4. Demonstração da aferição do pH



Fonte: Acervo pessoal (20 de fev. De 2019).

5.8 Análise estatística

Para análise dos resultados de microbiota foi utilizado o software Mothur (versão 1.31.2). A alfa diversidade foi indicada pelo número de OTUs (número de gêneros) e

índice de Chao (riqueza) e pelos índices Inverso de Simpson e Shannon (diversidade). A comparação entre os grupos foi realizada por meio de um teste T. A beta diversidade foi avaliada usando o índice de Jaccard, que avalia a composição da comunidade (ou seja, quais bactérias estão presentes ou ausentes em uma comunidade), e pelo índice de Yuee Clayton, que avalia a estrutura da comunidade (ou seja, quais bactérias estão presentes com base em sua abundância em uma comunidade). Gráficos de análise de coordenadas principais (PCoA), realizado em 2 dimensões, foram obtidos para comparar as amostras de cada grupo. A análise de variância molecular (AMOVA) foi usada para comparar a composição e a estrutura da comunidade entre os grupos. O tamanho do efeito da análise discriminante linear (LEfSe) foi usado para encontrar associações significativas entre abundâncias relativas de ambos os grupos. Nesse caso, foi aplicado o Kruskal-Wallis, teste não paramétrico para detectar diferenças entre os grupos e, em seguida, um Wilcoxon não pareado, que é um teste de soma de classificação. O resultado de Análise Discriminante Linear (LDA) maior que 2 foi considerado significativo. Para todas as análises foi considerado significativo quando $p < 0.05$.

Os demais resultados obtidos foram analisados através do software R versão 3.6.1, sendo previamente realizada análise descritiva das variáveis individualmente, e teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade.

Para as variáveis que não atenderam as premissas estatísticas, variáveis qualitativas, onde os dados comparados não foram paramétricos, foi realizado o teste de Mann-Whitney (teste de Wilcoxon). Já para as comparações que envolveram dados quantitativos (pH) e paramétricos, foi utilizado o teste t de Student, considerando grupos não dependentes (animais diferentes): teste t não pareado.

Foram considerados significativos valor de p menor que 5% ($p < 0.05$).

6 RESULTADOS

Foram verificadas diferenças entre os grupos para as variáveis “presença de cárie periférica”, “grau cárie periférica” e “classe cárie periférica”, rejeitando a hipótese nula, e destacando diferenças entre os grupos (tabela 2).

Em relação à presença de cárie periférica, no GBTCS, 20% dos animais apresentaram cáries periféricas em pré-molares e molares maxilares, 60% em molares maxilares, 10% em molares mandibulares e 10% não apresentaram cáries; o que diverge dos animais do GATCS, onde 20% apresentavam presença de cárie periférica em molares maxilares e mandibulares e 80% em todos os quadrantes ($p = 0,001$) (tabela 2).

Em relação ao grau desta cárie periférica, que também foi divergente para os grupos avaliados, no GBTCS, 80% das cáries eram de grau 1, 10% de grau 2 e 10% apresentavam ausência de cárie conforme já destacado; já no GATCS, 10% das cáries eram de grau 1, 40% de grau 2 e 20% de grau 3 e 30% de grau 4 ($p = 0,01$). Para a classe desta cárie periférica também foi verificada diferença entre os grupos, sendo para o GBTCS 70% em classe 1, 20% em classe 2 e 10% com ausência de cárie periférica. Já no GATCS, 90% das cáries periféricas apresentavam classe 1 e 90% classe 2 ($p = 0,05$).

O restante das variáveis qualitativas não apresentou diferença significativa entre grupo controle e experimental.

Tabela 2. Avaliação da cárie periférica e infundibular na cavidade oral dos animais avaliados. São Paulo, SP, 2022. (n = 20).

Variável	Grupo	Categorias	n (%)	p
Presença de cárie periférica	GBTCS	1: Pré molares e molares maxilares	2 (20)	0,001
		2: Molares maxilares	6 (60)	
		3: Molares maxilares e mandibulares	0	
		4: Molares mandibulares	1 (10)	
		5: Todos os quadrantes	0	
		6: Ausência de cárie	1 (10)	
	GATCS	1: Pré molares e molares maxilares	0	
		2: Molares maxilares	0	
		3: Molares mandibulares	0	
		4: Molares maxilares e mandibulares	2 (20)	
		5: Todos os quadrantes	8 (80)	
		6: Ausência de cárie	0	
Presença de cárie infundibular	GBTCS	1: Pré molares maxilares	3 (30)	>0,05
		2: Molares maxilares	0	
		3: Todos os quadrantes	1 (10)	
		4: Ausência de cárie	6 (60)	
	GATCS	1: Pré molares maxilares	0	
		2: Molares maxilares	1 (10)	
		3: Todos os quadrantes	4 (40)	
		4: Ausência de cárie	5 (50)	
Grau cárie periférica	GBTCS	1: Grau 1	8 (80)	0,01
		2: Grau 2	1 (10)	
		3: Grau 3	0	
		4: Grau 4	0	
		5: Ausência de cárie	1 (10)	
	GATCS	1: Grau 1	1 (10)	
		2: Grau 2	4 (40)	
		3: Grau 3	2 (20)	
		4: Grau 4	3 (30)	
		5: Ausência de cárie	0	

Variável	Grupo	Categorias	n (%)	p
Classe cárie periférica	GBTCS	1: Classe 1	7 (70)	0,05
		2: Classe 2	2 (20)	
		3: Ausência de cárie	1 (10)	
	GATCS	1: Classe 1	1 (10)	
		2: Classe 2	9 (90)	
		3: Ausência de cárie	0	
Grau cárie mesial infundibular	GBTCS	1: Grau 1	2 (20)	>0,05
		2: Grau 2	2 (20)	
		3: Grau 4	0	
		4: Ausência de cárie	6 (60)	
	GATCS	1: Grau 1	3 (30)	
		2: Grau 2	0	
		3: Grau 4	2 (20)	
		4: Ausência de cárie	5 (50)	
Classe cárie mesial infundibular	GBTCS	1: Classe 1	2 (20)	>0,05
		2: Classe 2	0	
		3: Ausência de classe e/ou cárie	8 (80)	
	GATCS	1: Classe 1	2 (20)	
		2: Classe 2	1 (10)	
		3: Ausência de classe e/ou cárie	7 (70)	
Grau cárie distal infundibular	GBTCS	1: Grau 1	1 (10)	>0,05
		2: Grau 2	1 (10)	
		3: Grau 3	0	
		4: Grau 4	0	
		5: Ausência de cárie	8 (80)	
	GATCS	1: Grau 1	1 (10)	
		2: Grau 2	0	
		3: Grau 3	1 (10)	
		4: Grau 4	2 (20)	
		5: Ausência de cárie	6 (60)	

Variável	Grupo	Categorias	n (%)	p
Classe cárie distal infundibular	GBTCS	1: Classe 1	1 (10)	>0,05
		2: Classe 2	0	
		3: Ausência de classe e/ou cárie	9 (90)	
	GATCS	1: Classe 1	2 (20)	
		2: Classe 2	1 (10)	
		3: Ausência de classe e/ou cárie	7 (70)	

Fonte: Acervo pessoal

Em relação aos resultados de pH da cavidade oral dos animais, não foi encontrada diferença entre o GBTCS e GATCS para os parâmetros de pH nas diferentes regiões da cavidade oral (tabela 3).

Tabela 3. Avaliação do pH oral dos animais avaliados. São Paulo, SP, 2022. (n = 20).

Variável	Grupo	Média	Desvio Padrão	Mínimo - máximo	p
pH incisivo superior	GBTCS	7,32	0,311	6,7 - 7,7	0.1314
	GATCS	7,09	0,338	6,7 - 7,6	
pH incisivo inferior	GBTCS	7,6	0,286	7,0 - 8,1	0.6896
	GATCS	7,65	0,263	7,2 - 8,2	
pH saída gândula parotídea esquerda	GBTCS	8,05	0,084	7,9 - 8,2	0.9084
	GATCS	8,06	0,254	7,6 - 8,4	
pH saída gândula parotídea direita	GBTCS	8,17	0,170	7,9 - 8,5	0.9109
	GATCS	8,18	0,220	7,7 - 8,4	
pH fundo esquerdo	GBTCS	8,17	0,170	7,9 - 8,5	0.6335
	GATCS	8,18	0,220	7,7 - 8,4	
pH fundo direito	GBTCS	8,1	0,149	8,0 - 8,4	0.5632
	GATCS	8,15	0,222	7,6 - 8,4	

Fonte: Acervo pessoal.

Já para a presença de diastemas na cavidade oral, devido à distribuição não paramétrica e irregular das porcentagens, foi realizada uma análise descritiva das variáveis qualitativas, representado assim em porcentagem a distribuição dessas alterações em cada quadrante dentário, classificado segundo o modelo de numerologia dentária de Triadan (tabela 4).

Tabela 4. Avaliação da presença de diastema em válvula e na cavidade oral dos animais avaliados. São Paulo, SP, 2022. (n= 20).

Variável	Grupo	Categorias	n (%)
Diastema Aberto	GBTCS	1: Quadrante 1	0
		2: Quadrante 2	0
		3: Quadrante 3	0
		4: Quadrante 4	1 (10)
		5: Quadrante 1 e 2	0
		6: Quadrante 3 e 4	0
		7: Ausente	9 (90)
		8: Todos os quadrantes	0
	GATCS	1: Quadrante 1	0
		2: Quadrante 2	0
		3: Quadrante 3	0
		4: Quadrante 4	1 (10)
		5: Quadrante 1 e 2	1 (10)
		6: Quadrante 3 e 4	4 (40)
		7: Ausente	3 (30)
		8: Todos os quadrantes	1 (10)
Diastema Válvula	GBTCS	1: Quadrante 1	1 (10)
		2: Quadrante 2	0
		3: Quadrante 3	0
		4: Quadrante 4	1 (10)
		5: Quadrante 1 e 2	1 (10)
		8: Quadrante 3 e 4	1 (10)
		9: Ausente	6 (60)

	10: Todos os quadrantes	0
	1: Quadrante 1	0
	2: Quadrante 2	2 (20)
	3: Quadrante 3	0
	4: Quadrante 4	0
GATCS	5: Quadrante 1 e 2	0
	8: Quadrante 3 e 4	3 (30)
	9: Ausente	5 (50)
	10: Todos os quadrantes	0

Fonte: Acervo pessoal.

Em relação aos resultados de microbiota oral, inicialmente tem-se os índices de diversidade alfa (tabela 5), que são responsáveis por caracterizar a comunidade microbiológica da cavidade oral. Para o índice de Chao (que estima a riqueza total, ou seja, o número de espécies de bactérias), índice invertido de Simpson e índice de Shannon (estes dois últimos avaliando a composição e a abundância relativa de cada bactéria) não foram observadas diferenças entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 5. Avaliação dos índices de diversidade alfa. São Paulo, SP, 2022. (n = 20)

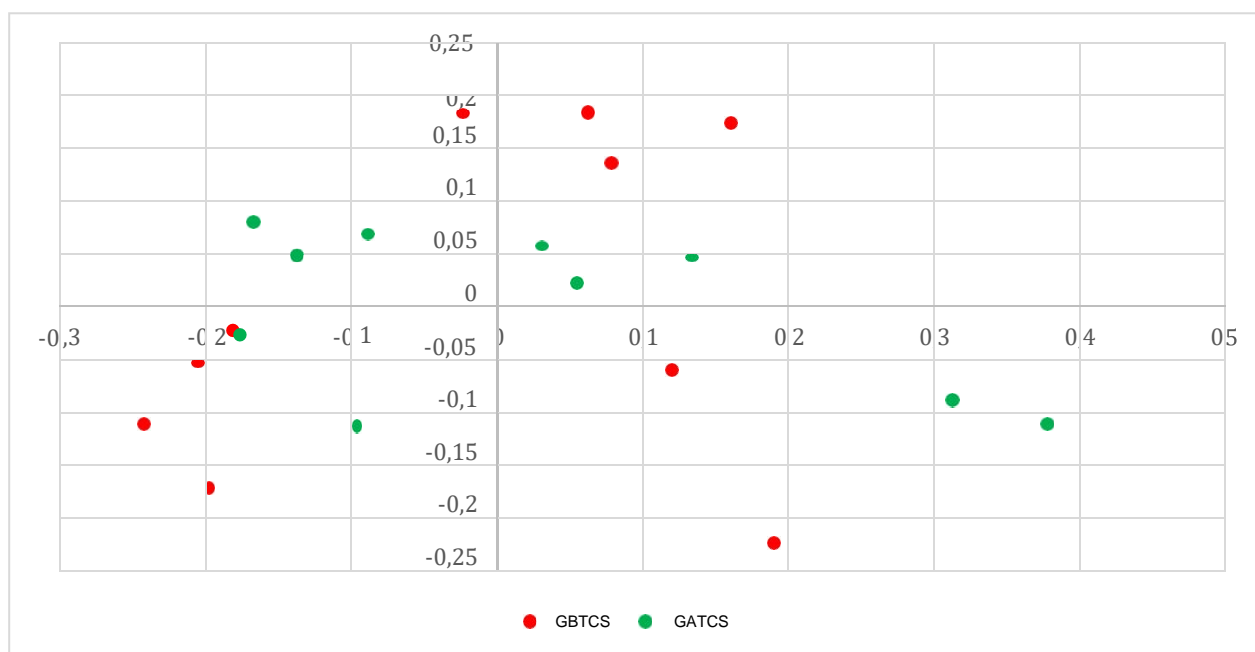
Item	Grupo		P
	GBTCS	GATCS	
Índice de Chao	182,654	213,096	0,1288
Índice invertido de simpson	4,488	3,958	0,2338
Índice de shannon	1,906	1,960	0,5916

Fonte: Acervo pessoal.

Para fazer as observações com relação à beta diversidade, inicialmente, foram construídos gráficos de análise de coordenadas principais (PCoA).

Na figura 6, é possível observar o gráfico de composição (membership), comparando GBTCS x GATCS, ou seja, levando em consideração todas as bactérias presentes, independente da sua abundância. Nesse tipo de gráfico, quanto mais próximos os pontos são entre si, maior a semelhança entre a microbiota oral de cada cavalo e quanto mais distantes, maior a diferença.

Figura 6. Gráfico de composição (membership) comparando GBTCS (Grupo Baixo Teor de Carboidratos Soluveis) versus GATCS (Grupo Alto Teor de Carboidratos Soluveis).



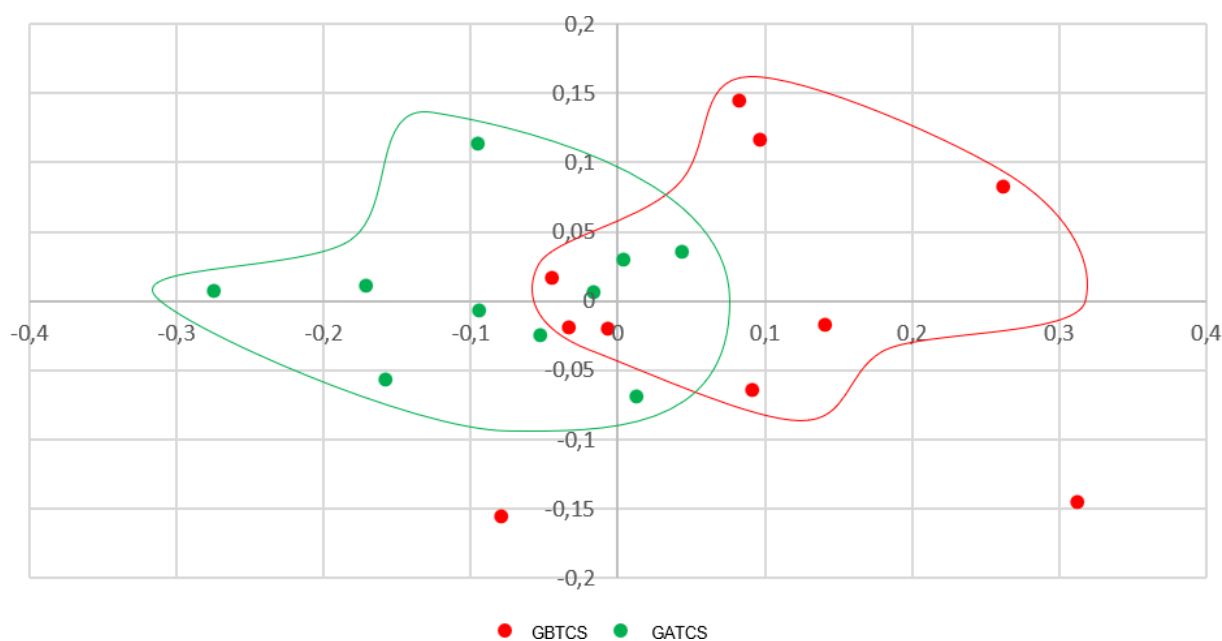
Fonte: Acervo pessoal.

Por meio desse resultado (figura 7) foi possível observar que não há um padrão muito definido de divisão entre os grupos e, por esse motivo, não foi observada significância ($p = 0.107$).

Já em relação à figura 6, o gráfico apresentado é o da estrutura (structure), ou seja, além da composição bacteriana, também é levada em consideração a abundância

relativa de cada componente da comunidade; e nesse caso, pode-se observar que existe um agrupamento de cada tratamento, indicando diferença significativa entre GBTCS e GATCS ($p = 0,003$), o que significa que, embora possa existir uma variação interindividual em relação a quais espécies de bactéria cada cavalo possui na microbiota oral, quando se considera a composição e a quantidade de cada uma delas, existe um perfil semelhante para animais que consomem o mesmo tipo de dieta.

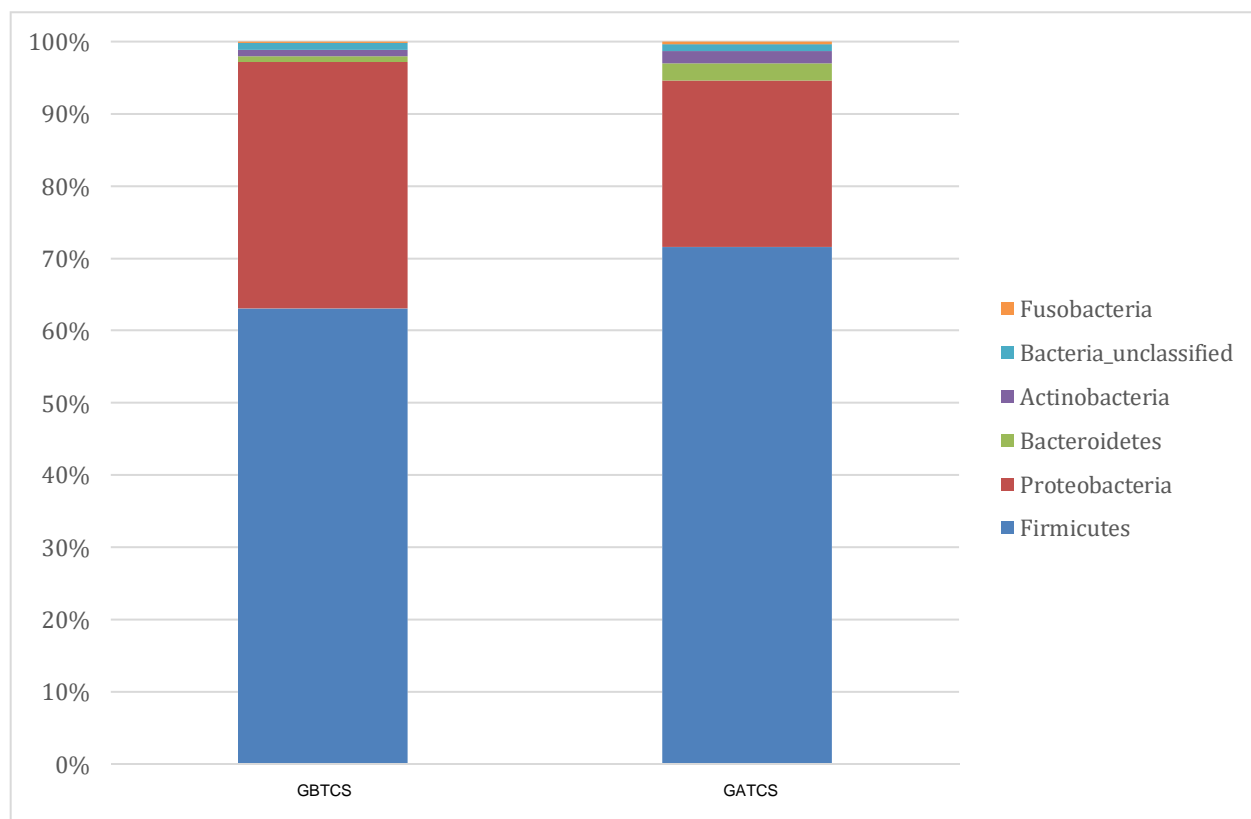
Figura 7. Gráfico de estrutura (structure) comparando GBTCS (Grupo Baixo Teor de Carboidratos Solúveis) versus GATCS (Grupo Alto Teor de Carboidratos Solúveis).



Fonte: Acervo pessoal.

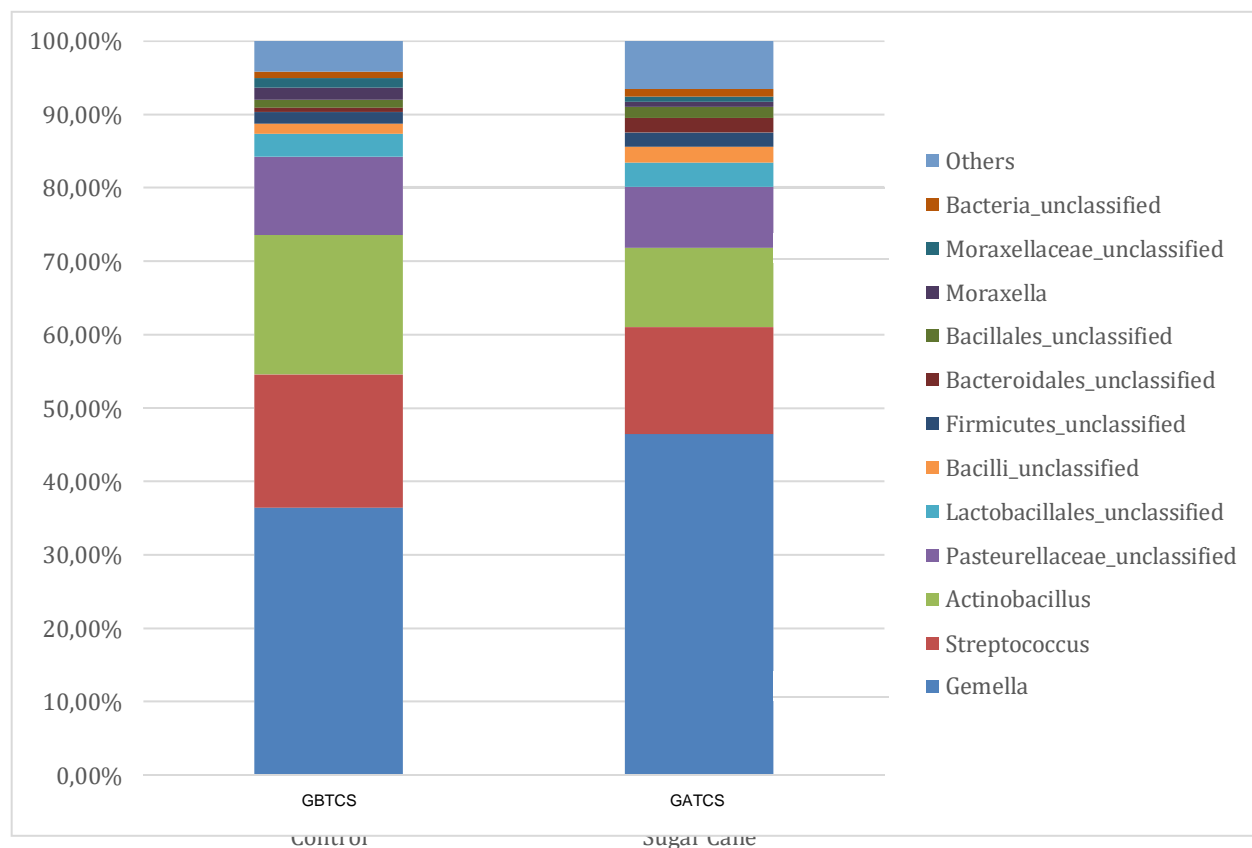
Posteriormente, foram realizadas comparações nos níveis filo (figura 8) e gênero (figura 9), considerando as bactérias que tinham ao menos 1% de abundância relativa.

Figura 8. Gráfico com a abundância relativa em relação aos filos comparando GBTCS (Grupo Baixo Teor de Carboidratos Solúveis) versus GATCS (Grupo Alto Teor de Carboidratos Solúveis).



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 9. Gráfico com a abundância relativa em relação aos gêneros comparando GBTCs (Grupo Baixo Teor de Carboidratos Solúveis) versus GATCS (Grupo Alto Teor de Carboidratos Solúveis).

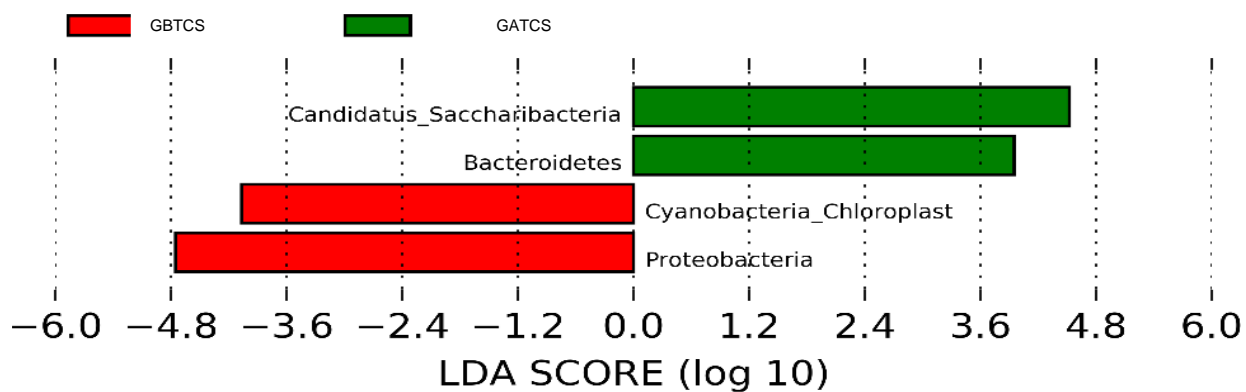


Fonte: Acervo pessoal.

Além disso, foi realizada Análise Discriminante Linear (LDA Score) com o intuito de demonstrar associações entre cada gênero de bactéria e os grupos estudados. Quando o valor de LDA é maior que 2 para um gênero em determinado grupo, implica que esse microorganismo possui abundância relativa significativamente maior que no outro grupo, sendo considerado um potencial marcador para aquele tipo de dieta. O mesmo vale para outras ordens taxonômicas como filo, classe, ordem e etc.

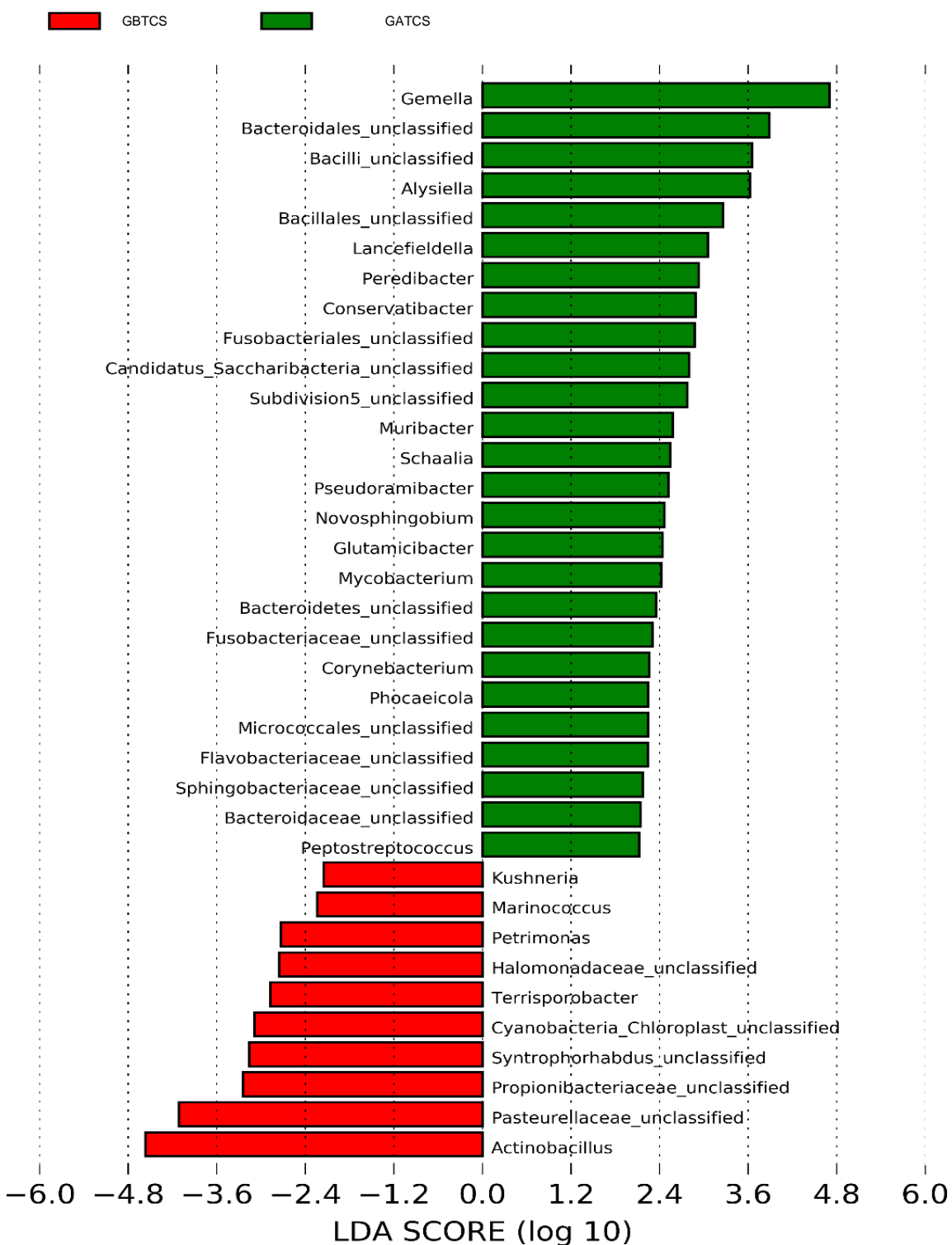
Na figuras 10 estão ilustrados os filós *Candidatus Saccharibacteria* e *Bacteroidetes* que apresentaram diferença no GATCS, e *Cyanobacteria_Chloroplast* e *Proteobacteria* para os GBTCs. Em relação aos gêneros, a figura 11 destaca os que foram significativos (LDA>2).

Figura 10. Análise Discriminante Linear (LDA Score) de Filos que apresentaram diferença significativa ($LDA > 2$) comparando GBTCS (Grupo Baixo Teor de Carboidratos Solúveis) versus GATCS (Grupo Alto Teor de Carboidratos Solúveis).



Fonte: Acervo pessoal.

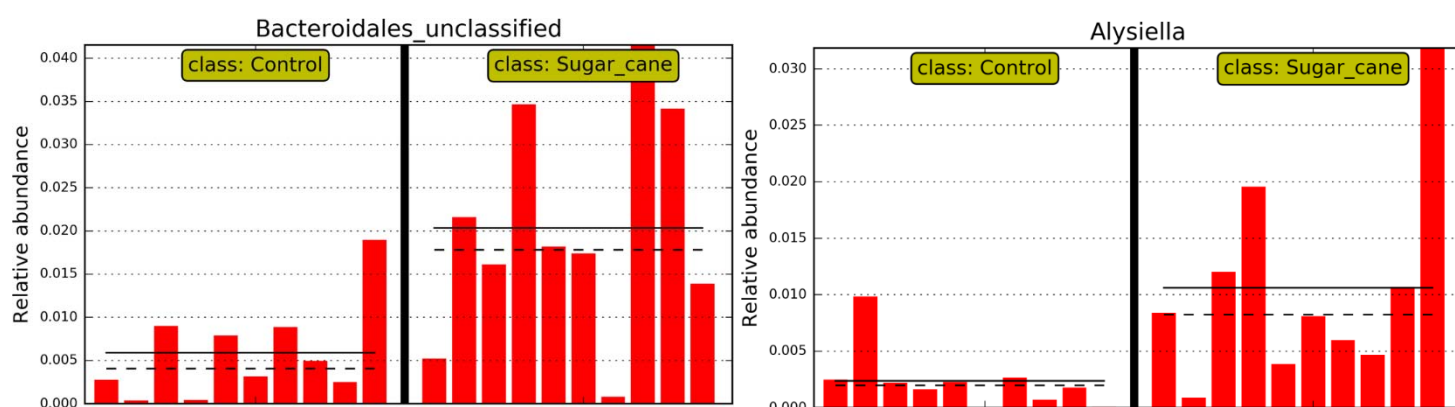
Figura 11. Análise Discriminante Linear (LDA Score) de gêneros que apresentaram diferença significativa ($LDA > 2$) comparando GBTCS (Grupo Baixo Teor de Carboidratos Solúveis) versus GATCS (Grupo Alto Teor de Carboidratos Solúveis).



Fonte: Acervo pessoal.

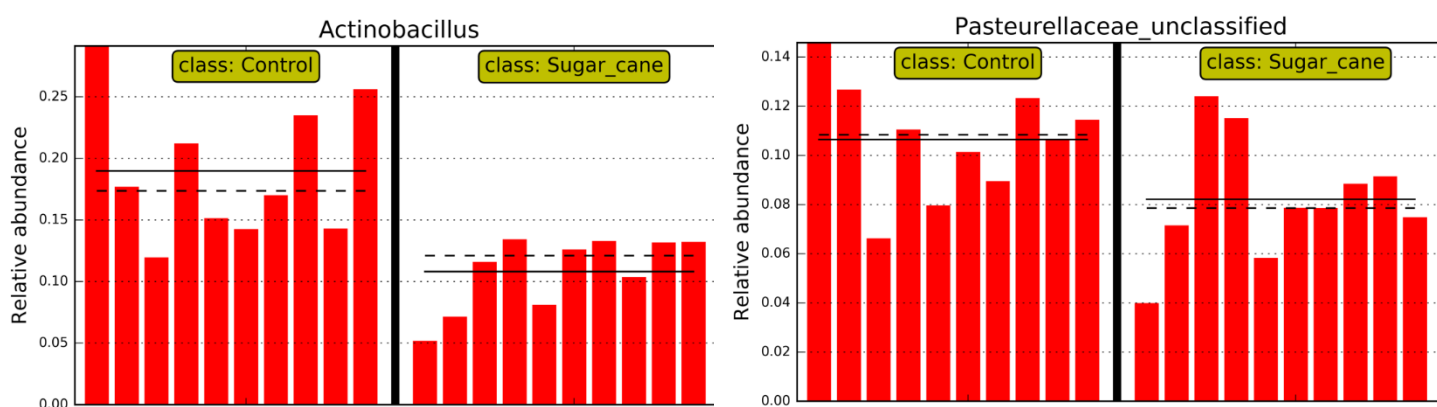
Assim, em relação aos gêneros, foram considerados significativos em cada grupo GBTCS X GATCS, na Análise Discriminante Linear (LDA Score,) os que tiveram um $LDA > 2$ (figura 11), e obtiveram-se os dados de cada gênero, em cada animal, nos diferentes grupos. Assim, os gêneros Bacteroidales e Alysiaella foram os mais discriminativos do GATCS e Actinobacillus e Pasteurellaceae_unclassified no GBTCS (figuras 12 e 13).

Figura 12. Distribuição individual dos animais nos GBTCS (Control) X GATCS (Sugar_cane).



Fonte: Acervo Pessoal.

Figura 13. Distribuição individual dos animais nos GBTCS (Control) X GATCS (Sugar_cane).



Fonte:Acervo pessoal

7 DISCUSSÃO

Quando se observam os resultados da composição bromatológica dos alimentos em que cada grupo experimental se alimentava neste estudo, pode-se observar que tanto o GATCS 1, quanto GACTS 2 (subdivididos dessa forma na análise bromatológica) possuem teores de amido e carboidrato solúveis consideravelmente maiores do que os volumosos dos grupos GBTCS 1 e GBTCS 2 (subdivididos dessa forma na análise bromatológica). Valores estes de amido representando 10,49% da cana de açúcar do GATCS 1 e 18,42% do GATCS 2, para os carboidratos solúveis 35,9% representavam a composição de cana do GATCS 1 e 27,31% do GATCS 2. Esses são composições quase que 3 vezes maiores do que as encontradas no volumoso estrela-roxa no GBTCS 1 e quase 10 vezes maiores do que as encontradas no volumoso Tifton 85 do GBTCS 2.

Essas composições mostram a diferença dietética entre os grupos estudados, sendo que o grupo com alto teor de carboidrato solúvel (GATCS) possui, em seu manejo, quantidades significativas de açúcares, vistas tanto na composição bromatológica em relação ao amido, quanto ao carboidrato solúvel. Estes elementos (amido e carboidratos solúveis) se diferem quanto a quantidade de ligações moleculares de glicose, sendo o amido, moléculas de glicose unidas por ligações α -1,4 e ramificadas por ligações α -1,6 e os carboidratos solúveis, açúcares como: glicose, frutose, galactose, frutanas e sacarose (ZAGO, 1991).

Ainda, em relação ao manejo alimentar, considerando o concentrado fornecido aos grupos nesse estudo, também foi possível observar que no GATCS as porcentagens de amido são bem mais elevadas, 83,53% e 82,50% respectivamente aos GATCS 1 e GATCS 2, enquanto nos GBTCS1 e GBTCS2, 25,33% e 17,31%, respectivamente. Tais manejos em nosso estudo, demonstram que os animais do GATCS receberam uma dieta que predispõe ao desenvolvimento de cáries, já que na fisiopatogenia da doença, o excesso de açúcar na alimentação dos equinos favorece o aparecimento de afecções odontológicas, como as cáries dentárias (DIXON & DACRE, 2005; BORKENT et al., 2020).

Hoshino et. al. (2004) denomina a doença como uma enfermidade complexa, multifatorial e causada por uma desarmonia no equilíbrio fisiológico entre os minerais do

dente e o fluido do biofilme, o qual está diretamente relacionado com as bactérias presentes. Neste estudo, todos estes fatores relacionados à multifatorialidade do desenvolvimento da cárie dito anteriormente, mais o excesso de açúcares presentes na dieta são fatores que contribuem nessa diversidade de causas da doença, isso corrobora com Marsh (2000), o qual descreveu a cárie como uma consequência da interação entre a microbiota oral, a dieta, a dentição e o meio ambiente oral.

Ao considerar a incidência da cárie na população equina, cavalos submetidos à investigação de doenças dentárias, Ramzan e Palmer (2011) relatam uma incidência acima de 69,4% de cáries periféricas. Dois estudos epidemiológicos recentes também confirmaram elevadas frequências de cáries periféricas, em duas grandes populações equinas, uma no Reino Unido (BORKENT et al., 2017), e outra na Austrália Ocidental (JACKSON et al., 2018), com incidências gerais de 51,7% e 58,8%, respectivamente.

O tipo de alimentação e quantidades particularmente elevadas de carboidratos solúveis em feno, foi associado ao aumento de cáries periféricas na Austrália Ocidental (JACKSON et al., 2018). Da mesma forma, a alimentação de forragens fermentadas e concentrados também foi sugerida como causa de cárie periférica em publicação anterior (GERE & DIXON 2010). Todas estas discussões, os estudos e teorias apresentadas até aqui, fundamentaram nosso estudo e, quando foram comparadas as afecções odontológica de equinos alimentados com cana de açúcar aos alimentados com gramínea *Cydnodon* (GATCS e GBTCS), verificou-se diferença em relação à presença de cáries periféricas, sendo que o alimento com maior teor de carboidratos solúveis, como a cana de açúcar, favorece o aparecimento de cáries periféricas de forma a se observar no GBTCS 20% de animais com cáries periféricas em pré-molares e molares maxilares, 60% em molares maxilares, 10% em molares mandibulares e 10% não apresentavam cáries; o que diverge dos animais do GATCS, onde 20% apresentavam presença de cáries periféricas em molares maxilares e mandibulares e 80% em todos os quadrantes ($p = 0.001$). Resultado este que corrobora com Barnett (2019), o qual constatou, em seu estudo, que equinos alimentados com elevados teores de carboidratos solúveis, possuíram maior acometimento dos molares, tanto mandibulares quanto maxilares, e relatou que nesta população com esse perfil dietético houve uma maior predisposição à fermentação, acidificação do pH e deteriorização dos tecidos dentários. Os molares, dos

equinos, são elementos dentários que, pela própria fisiologia da mastigação, acumulam maior resíduo alimentar e, por sua vez possuem uma maior taxa de fermentação local. Além disso, estes são dentes com alterações oclusais comuns, como os diastemas, o que predispõe ao maior acúmulo de alimento nessas regiões dentárias (Jackson et al. 2019).

Neste ínterim, além das cáries periféricas, neste estudo observou-se diferença entre os grupos, em relação à presença de diastema do tipo aberto, sendo que 10% dos animais do GBTCS apresentaram esta alteração e 70% no GATCS. Quando a comparação foi realizada para o diastema do tipo em válvula, no GBTCS, 40% dos animais apresentaram esta alteração, enquanto no GATCS, 50%. Apesar de ter sido realizada apenas uma análise descritiva das alterações dentárias, foi possível demonstrar que equinos que receberam dietas à base de cana de açúcar desenvolveram mais cáries periféricas e diastemas do que animais que tinham como base do volumoso gramínea *Cynodon sp.*

Além disso, pudemos observar também que tanto o diastema em válvula quanto o aberto, estavam mais presentes em quadrantes de dentes mandibulares, o que levanta a hipótese que nesses dentes há um maior impacto mastigatório pela pressão dos dentes maxilares e da própria gravidade, além da anatomia dentária em si fazer com que essa área dentária seja mais susceptível à essas alterações.

Jackson et al. (2019) compararam características, como a idade do cavalo e a presença de dentes deslocados e diastemas, encontraram que cavalos com cáries periféricas foram mais propensos a ter acúmulo de alimento interdental do que aqueles sem cárie periférica em suas arcadas maxilar e mandibular ($p= 0.02$ e $p < 0.001$, respectivamente). E essa associação foi mais forte nas arcadas mandibulares, com 77,1% ($p < 0,001$). Nesse mesmo estudo, quando comparada a anatomia dos dentes mandibulares e maxilares e a associação com diastemas foi destacada a proximidade do esmalte periférico entre os dentes adjacentes e o conteúdo mínimo de cimento periférico (pC) na posição interdental nos dentes maxilares versus a forma mais enrolada interdentalmente e a maior proporção de cimento periférico na posição interdental nos dentes mandibulares. Ainda segundo Jackson et al. (2019), essas diferenças anatômicas, são justificadas devido a maior justaposição do cimento periférico dos dentes maxilares

em relação aos mandibulares e como a carie periférica em seu primeiro grau afeta essa porção dentária, os dentes maxilares mandibulares possuem maior predisposição ao acúmulo de alimento e formação de diastemas. A teoria apresentada é comprovada em nosso estudo, já que as informações encontradas foram semelhantes, a qual independente do tipo de diastema, seja aberto ou em válvula, sua prevalência ocorreu em maiores porcentagens nos quadrantes mandibulares, independente do grupo, GATCS ou GBTCS.

Independente da região onde maior acontece esses processos, é interessante ressaltar como as alterações oclusais, periodontais e cariogênicas estão diretamente interligadas entre si, uma favorecendo o aparecimento da outra, o que torna as afecções odontológicas multifatoriais, complexas e cada vez mais interessantes de serem estudadas e entendidas.

Neste estudo, quando comparou-se o grau das cáries periféricas, verificou-se divergência entre os grupos avaliados, tendo no GATCS, 10% das cáries eram de grau 1, 40% de grau 2 e 20% de grau 3 e 30% de grau 4 ($p = 0,01$), ou seja, nos animais com alimentação à base de cana de açúcar, o grau de carie periférica foi mais grave, envolvendo lesões que afetam o cemento e esmalte adjacentes no caso do grau 2; o cemento, esmalte e dentina no grau 3; e alguns ainda, lesões as quais causaram a perda da integridade do dente (fraturas secundárias e/ou infecção apical). Já o GBTCS 80% das cáries de grau 1, 10% de grau 2 e 10% apresentaram ausência de carie, o que significa que cavalos alimentados com volumoso à base de graminea *Cynodon sp*, possuíam graus mais leves da doença. Ainda, quando comparou-se a classe desta carie periférica, nomenclatura utilizada para as cáries em grau 1, também foi verificada diferença entre os grupos, sendo para o GBTCS 70% em classe 1, 20% em classe 2 e 10% com ausência de carie periférica; no GATCS, 10% das cáries periféricas apresentavam classe 1 e 90% classe 2 ($p = 0,05$), novamente sendo possível observar que mesmo quando comparamos os diferentes grupos para grau 1 da carie periférica, os animais que se alimentaram com cana de açúcar possuíam lesões mais severas com cemento completamente perdido em algumas áreas.

Essas desmineralizações nos tecidos dentários estão diretamente relacionadas ao fator pH; segundo Miller (1889), quando o pH diminui abaixo do nível crítico de 5,5, os

Íons minerais são liberados dos cristais de hidroxiapatita do esmalte, iniciando a cárie. O mesmo ocorre no cimento, em nível menos ácido, ou seja, com pH de 6,7 (TANZER 1992), enquanto o pH crítico em dentina é cerca de 6,0 (VANUSPONG et al. 2002). Lundström & D. Birkhed (2020) descrevem que o pH crítico do cimento equino não é bem conhecido, mas é bem determinado para esmalte, como 5,7 e dentina, como 6,2. Lundström et al. (2020) demonstraram, *in vivo*, em superfícies dentárias cariadas, uma redução no pH da placa após a exposição à sacarose em cavalos. A redução do pH oral é justificada pela produção de ácido por microorganismos orais após o consumo de açúcar, o que favorece o aparecimento das cáries periféricas (DACRE, 2005). Neste estudo, embora tenham sido encontradas cáries periféricas, não foram observadas diferenças entre os valores de pH da cavidade oral dos animais alimentados com cana de açúcar (GATCS) e os alimentados com graminea *Cynodon sp* (GBTCS), assim como nas diferentes regiões da cavidade oral. Possivelmente, o método de análise do pH da cavidade oral, mensurado sobre o tecido oral ou sobre a lesão tecidual, não tenha sido específico o bastante para detectar a variação do pH em níveis teciduais, obtendo-se valores de pH da cavidade oral como todo, possivelmente devido à influência das secreções salivares, atuando como tampão.

Ao se observar os valores médios de pH por região da cavidade oral, ou seja, o pH na região de incisivos superiores, variaram de 6,7 a 7,6 nos dois grupos, já nos incisivos inferiores essa variação foi de 7,0 a 8,2, valores menores quando comparado com os valores na região da saída da glândula parotídea e fundo da boca, nos quais os valores vão de 7,9 a 8,4, o que sugere uma ação tamponante dessa secreção junto a homogenização salivar realizada pela movimentação da língua, sendo mais eficiente no fundo da cavidade oral, valores médios esses que independente dos grupos, diferem de Miller (1889), Tanzer (1992), Vanuspong et al. (2002), ou seja nenhuma medição de pH neste estudo atingiu o intervalo considerado potencial para a desmineralização dos tecidos dentários.

Embora seja conhecido que o tipo de forragem não interfira na composição da saliva dos equinos (Lundström et al., 2020), maiores estudos sobre o pH salivar, ao longo da matigação e de acordo com o tipo de alimentação, são necessários, para melhor elucidar o processo de desenvolvimento de cáries periféricas em equinos.

Quanto à cárie infundibular, em nosso estudo não houve diferença entre GBTCSe GATCS, não sendo possível observar diferença entre os animais que se alimentaram com cana de açúcar e os que se alimentaram com gramínea *Cynodon sp.* Estudos sobre as cáries infundibulares em equinos precisam ser mais explorados, visto que a literatura apresente a maioria dos estudos relacionados às cáries em animais braquiodontes, pela semelhança ao processo em humanos (Borkent et. al., 2017). Como a cárie infundibular é uma particularidade do tipo de dentição dos equinos, os estudos se limitam à esta espécie (BAKER 1974; KILIC et al. 1997; WINDLEY et al. 2009; FITZGIBBON et al. 2010; BORKENT et. al. 2017). Desta forma, o que temos no momento é que a presença de áreas de hipoplasia cementária nos canais vasculares predisponha ao desenvolvimento da cárie infundibular central localizada e, quando essas áreas de hipoplasia cementária infundibular são expostas à cavidade oral com desgaste dentário, alimentos e microorganismos orais entram nesse defeito e predisõem ao desenvolvimento de lesões cariosas infundibulares (HORBAL et al., 2019).

Com relação à avaliação da microbiota oral, nos equinos alimentados com cana de açúcar e gramínea *Cynodon sp.* utilizou-se os índices de diversidade alfa, os quais caracterizam uma comunidade (amostra de um indivíduo). Os índices de diversidade alfa englobam cálculos de riqueza (número de espécies diferentes) e de diversidade. A diversidade é estimada por índices matemáticos que levam em consideração a riqueza e sua uniformidade (proporção /equidade, ou seja, quanto de cada uma existe dentro de uma comunidade). Quanto maior o número de espécies de bactérias (riqueza) e quanto mais proporcionais elas forem entre si, maior é a diversidade (KIM et al., 2017). Neste estudo foram aplicados quatro cálculos de diversidade alfa: número de espécies observadas, Chao, Inverso de Simpson e de Shannon.

Não foram observadas diferenças entre os grupos, em relação ao índice Chao, o qual estima a riqueza total de uma comunidade a partir de uma amostra, ou seja, o número de espécies em uma comunidade. É um método não paramétrico que calcula os OTUs que foram observados.

De forma semelhante, tanto para esse índice inverso de Simpson, quanto de Shannon, não houve significância nas comparações dos grupos. Os índices de diversidade de Shannon e Simpson consideram as abundâncias relativas das espécies

dentro de uma comunidade e, por isso, fornecem mais inferência sobre a composição da mesma. O índice de Shannon coloca um peso maior na riqueza de espécies, enquanto o índice de Simpson considera mais a uniformidade das espécies em sua medição. Além disso, o índice de Shannon mede o grau médio de incerteza para prever qual é a espécie da bactéria, quando uma delas é escolhida aleatoriamente. Já o índice de Simpson é o inverso, pois ele indica a espécie dominante e reflete a probabilidade de dois indivíduos pertencerem à mesma espécie quando escolhidos aleatoriamente. Entretanto, para este trabalho, para facilitar a interpretação dos dados, foi usado o índice Inverso de Simpson, que seria 1 dividido pelo valor de Simpson encontrado, e, por esse motivo, os valores encontram-se maiores que 1 e o resultado deve ser interpretado como, quanto maior o valor, maior a diversidade.

Os índices de diversidade Beta, são utilizados para comparar comunidades e são eles os índices de Jaccard, para composição e Yue and Clayton, para estrutura. Não foram observadas diferenças para o índice Jaccard, mas foram verificadas diferenças para Yue and Clayton ($p = 0,003$), indicando que a maioria dos organismos presentes em um grupo também estavam presentes no outro, mas em proporções diferentes. Estes resultados demonstram que existe semelhança entre os gêneros de bactérias dentro de cada grupo estudado. Ou seja, que animais alimentados com cana de açúcar possuíram uma abundância de bactérias parecidas entre si e o mesmo ocorreu para os animais alimentados com graminea *Cynodon sp.* Estes dados diferem do estudo realizado por Borkent et. al. (2019), envolvendo análise da microbiota dentária periférica equina, em que não obtiveram padrão de similaridade nos grupos estudados (cárie e saudável), para o índice Yue and Clayton.

Sendo assim, os resultados encontrados permitem que se aprofunde e observe essas diferenças de forma mais específica e em diferentes classes taxonômicas, como realizado em filo e gênero. Um LDA ou seja, Análise Discriminante Linear (LDA Score) de gêneros que foram consideradas significativas quando maior do que 2 é considerado um LDA alto e isso pode nos dizer sobre a possibilidade dessa bactéria ser uma indicadora, como por exemplo, de comer ou não comer uma dieta com alto teor de carboidrato solúvel, como as observadas para os filios *Candidatus Saccharibacteria* e Bacteroidetes para o GATCS, e *Cyanobacteria Chloroplast* e Proteobacteria para o GBTC

e diversos gêneros suprailustrados na figura 11.

Em estudo com microbiota oral em humanos, *Candidatus saccharibacteria* foi proposto como o novo nome para o filo para TM7, com base na análise genômica, que sugeriu que esse filo de bactérias, com genomas reduzidos, consomem principalmente compostos de açúcar. Além disso, os membros do filo TM7 são onipresentes na microbiota oral humana, e evidências acumuladas, os associam com doença periodontal e cárie (BOR et. al. 2019). De maneira semelhante, este estudo apresenta abundância relativa significativamente maior desse mesmo filo nos equinos alimentados com dieta a base de cana de açúcar, ou seja, altos índices de açúcares na dieta. Ainda, este grupo de equinos foi o que apresentou maiores proporções de cáries periféricas e diastemas, dessa forma, este estudo é pioneiro e apresenta-se como o primeiro a associar características da microbiota oral com o tipo de dieta e afecções odontológicas.

Em pessoas, até 99% da microbiota oral é representada pelos filios Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria, Candidatus Saccharibacteria, Spirochaetes e Tenericutes. Estudos correlacionam Bacteroidetes, Fusobacteria, Candidatus, Saccharibacteria, Spirochaetes e Synergistes atuando como indicativo ou alerta para o desenvolvimento de periodontite. Ainda, os filios *Actinobacteria* e *Proteobacteria* são predominantes em indivíduos humanos saudáveis, enquanto *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Candidatus saccharibacteria*, *Spirochaetes* e *Synergistes* estão mais presentes em indivíduos com periodontite (BARBOSA, 2019).

Esses resultados corroboram ao do nosso estudo, uma vez que Proteobacteria também foi associado aos equinos controle, alimentados com gramínea *Cynodon sp.* (GBTCS) e *Candidatus saccharibacteria* e Bacteroidetes nos equinos alimentados com cana de açúcar (GATCS), os quais também apresentaram maior presença de cáries periféricas e diastemas. Por outro lado, quando comparada a microbiota da cavidade oral de equinos com cáries periféricas e animais saudáveis, Borkent et. al. (2019) encontrou maior abundância *Actinobacteria* e *Proteobacteria* em seus grupos saudáveis, enquanto no grupo cárie, *Firmicutes*. Neste estudo, somente Proteobacteria assemelhou-se ao resultado encontrado.

Quando verificado no nível taxonômico gênero entre os equinos alimentados com cana de açúcar e gramínea *Cynodon sp.* (GATCS x GBTCS), podemos observar que

quando considerado o $LDA > 2$, temos uma quantidade maior de bactérias associada ao GATCS que ao GBTCs, e o mesmo pode ser observado no estudo de Borkent et al. (2019). Provavelmente, ocorre maior sinergismo entre esses microrganismos no próprio processo acidogênico oral, o qual ocorre quando há substrato, como o caso de açúcares advindos da dieta. Borkent et al. (2019), encontrou *Streptococcus* e *Olsenella* como gêneros discriminativos do grupo cárie periférica, resultado que difere do presente estudo, em que os gêneros mais discriminativos foram *Bacteroidales* e *Alysiella*.

Por outro lado, Yang et al. (2011) quando determinaram a composição da microbiota oral de humanos com cáries, encontraram *Bacteroidales* ($p = 0,062$) associado à doença, assim como neste estudo. Esse é um gênero de bactérias gram-negativas, com a forma de bacilo, anaeróbicas, e existem espécies móveis e imóveis. São bactérias acidogênicas e acidófilas, entre as quais as mais conspícuas são *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus*, cepas acidogênicas e acidúricas de *Neisseria spp.*, *Bacteroidis spp.*, *Actinomyces spp.* e *Streptococcus não-mutans*, às quais em conjunto, e em associações variadas, podem provocar cárie quando as condições ecológicas da cavidade oral favorecem (KLEINBERG, 2002). Na espécie equina não há relato de suas características para nenhum dos dois gêneros encontrados e para *Alysiella*, em humanos, também não é bem descrita.

Borkent et al. (2019), encontrou como gêneros mais discriminativos do grupo controle, *Gemella* e *Actinobacillus*, o que corrobora com o trabalho de Kennedy et al. (2016) que também encontraram *Gemella* e *Actinobacillus* como os gêneros mais associados com seu grupo controle. Gao et al. (2016) correlacionaram bactérias presentes nas áreas subgingivais de cavalos considerados saudáveis às bactérias do gênero *Actinobacillus* e *Pasteurellaceae_unclassified*. De maneira semelhante, neste estudo associou-se *Actinobacillus* aos equinos controle, alimentados com gramínea *Cynodon sp.* No entanto, estes resultados diferem do presente estudo, em relação a *Gemella*, a qual foi associada aos equinos alimentados com cana de açúcar. Possivelmente, o tipo de dieta possa ter interferido com esta discrepância, entre outros fatores.

8 CONCLUSÕES

Diante dos resultados encontrados nesse estudo, conclui-se que dentre os grupos estudados, os animais com alimentação à base de cana de açúcar e, portanto, com altos níveis de carboidratos solúveis na dieta, apresentaram maiores incidência de cáries periféricas, essas em graus mais severos. Não houve diferença entre os grupos para as cáries infundibulares, portanto não houve influência do tipo de alimentação e presença dessa afecção em ambos os grupos estudado.

Além disso, pudemos observar que tanto o diatema em válvula quanto o aberto, estavam mais presentes em quadrantes de dentes mandibulares, o que levanta a hipótese que nesses dentes há um maior impacto mastigatório pela pressão dos dentes maxilares e da própria gravidade, além da anatomia dentária em si fazer com que essa área dentária seja mais susceptível à essas alterações.

Para o Ph da cavidade oral, não houve acidificação do meio oral nos diferentes grupos estudados, independente do tipo de dieta. Sugere-se mais estudos e melhoria na técnica de mensuração do Ph para que haja uma acurácia maior em relação as áreas em que as cáries periféricas estão presentes, evitando assim o tamponamento salivar do meio.

No perfil microbiológico da cavidade oral, as bactérias associadas ao GATCS foram do gênero *Alysiellae Bacteroidales*, enquanto nos cavalos do grupo controle (GBTCS), *Actinobacillus e Pasteurellaceae_unclassified*.

Sugere-se que mais estudos correlacionando o perfil da microbiota oral, o perfil alimentar de cavalos e o desenvolvimento da cárie periférica; pouco ainda se sabe sobre o assunto nos equinos, o que torna este estudo pioneiro na área.

9 REFERÊNCIAS

AOAC. **Official methods of analysis**. 2006. Method 925.32, v. 34, p. 3.

APS, J.K.M.; MARTENS, L.C. Review: the physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. **Forensic science international**, v. 150, p. 119-131, 2005.

BARBOSA, N. A. Análise metagenômica da microbiota associada à doença periodontal. **Tese de doutorado do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA)**. 2019.

BAKER, G. J. Some aspects of equine dental decay. **Equine Vet J**, London, v. 6, p. 127-130, 1974.

BARNETT, T. P. Clinical insights: equine dentistry. **Equine Vet J**, London, v. 8, p. 277-279, 2019.

BOR, B. J.K. Bedree^{1,3}, W. Shi¹, J.S. McLean⁴, and X. He¹. *Saccharibacteria* (TM7) in the Human Oral Microbiome. **Journal of Dental Research**, v. 98, n. 5, p. 500-509, 2019.

BORKENT, D., REARDON, R.J.M., MCLACHLAN, G., SMITH, S. and DIXON, P.M. An epidemiological survey on the prevalence of equine peripheral dental caries in the United Kingdom and possible risk factors for its development. **Equine Vet. J.** v. 49, p. 480-485, 2017.

BORKENT, D., REARDON, R. J. M., MCLACHLAN, G., GLENDINNING, L. and DIXON, P. M. Microbiome analysis of equine peripheral dental caries using next generation sequencing. **Equine Vet J**, London, v. 52, p. 67-75, 2020.

BORKENT, D. & DIXON, P.M. Equine peripheral and infundibular dental caries: a review and proposals for their investigation. **Equine Vet. Educ.** v. 29, p. 621-628, 2015.

BRAGA, C. A. S. B. et al. Isolamento e identificação da microbiota periodontal de cães da raça Pastor Alemão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, p. 385-390, 2005.

BUCHALLA, W. Histological and clinical appearance of caries. In: MEYER-LUECKEL, H. et al. **Caries management-science and clinical practice**. Stuttgart: Verlag, 2013. chapter 3.

CHÁVEZ DE PAZ, L. E.; HAMILTON, I. R.; SVENSÄTER, G. Oral bacteria in biofilms exhibit slow reactivation from nutrient deprivation. **Microbiology**, Reading, v. 154, p. 1927-1938, 2008.

CHIAPPIN, S; ANTONELLI, G; GATTI, R; DE PALO E.F; Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. v.383, p.30–40,2007.

COLIN, G. *Traite de Physiologie Comparee*, 3rd edn. Paris: Bailliere, 1886.

CONWAY, E. J. *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*, 5th edn, 1962.

COSTA, M. C.; WEESE, J. C. Understanding the intestinal microbiome in health and disease. **The Veterinary Clinics of North America. Equine practice**, Philadelphia, v. 34, p. 1-12, 2015.

COX, A.; DIXON, P. M.; SMITH, S. Histopathological lesions associated with equine periodontal disease. **Equine Vet J**, London, v. 194, p. 386-391, 2012.

DACRE, I. T. Equine dental pathology. In: BAKER, G. J.; EASLEY, K. L. (Ed.). **Equine dentistry**. 2nd ed. Edinburgh: Elsevier Saunders, 2005. v. 33, p. 91-110.

DACRE, K. Applied equine dental development. **Focus Meeting**, Indianapolis, USA. 2006. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/aaepfocus/2006/kdacrel.pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2019.

DACRE, I.; KEMPSON, S.; DIXON, P. M. Equine idiopathic cheek teeth fractures. Part 1: pathological studies on 35 fractured cheek teeth. **Equine Vet J**, London, v. 39, p. 310-318, 2007.

DAWES, C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid. **Journal Canadian Dental Association**, Ottawa, v. 69, p. 722-724, 2003.

DITTRICH, J. R. et al. Comportamento ingestivo de equinos e a relação com o aproveitamento das forragens e bem-estar dos animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 130-137, 2010.

DIXON, P.M.; DACRE, I. A review of equine dental disorders. **The Veterinary Journal**, v. 169, p. 165-187, 2005.

DIXON, P. M.; DU TOIT, N.; DACRE, I. T. Equine dental pathology. In: EASLEY, K. J.; DIXON, P. M.; SCHUMACHER, J. (Ed.). **Equine dentistry**. 3rd ed. Edinburgh: Elsevier Saunders, v. 4, p. 129-147, 2010.

DIXON, P. M. Critical evaluation of ex vivo restoration of carious equine maxillary cheek teeth infundibulae following high-pressure gas and micro-particle abrasion. **Equine Vet J**, London, v. 200, p. 368-374, 2014.

DIXON P. M. Ceen S, Barnett T, O'Leary JM, Parkin TD, Barakzai S. A long-term study on the clinical effects of mechanical widening of cheek teeth diastemata for treatment of periodontitis in 202 horses (2008-2011). **Equine Vet J**. Jan; v.46(1), p.76-80, 2014.

DIXON, P. M. Equine peripheral and infundibular dental caries: a review and proposals for their investigation. **Equine Veterinary Education**, Newmarket, v. 29, p. 621-628, 2017.

EDWARDSSON, S. Characteristics of caries-inducing human streptococci resembling *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, New York, v. 13, p. 637-646, 1968.

FIGUEIREDO, M. D. et al. Valores de digestibilidade de alimentos volumosos para equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 28, n. 4, p. 766-772, 1999.

FITZGERALD, R. J.; KEYES, P. H. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. **Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 61, p. 9-19, 1960.

FITZGIBBON, C.M., DU TOIT, N. AND DIXON, P.M. Anatomical studies of maxillary cheek teeth infundibula in clinically normal horses. **Equine Vet. J.** v. 42, p.37- 43, 2010.

FRANDSON, R.D.; WILKE, W.L; FAILS, A.D. **Anatomy and physiology of farm animals**. John Wiley & Sons, 2009.

FURTADO, C. E.; BRANDI, R. A.; RIBEIRO, L. B. Utilização de coprodutos e demais alimentos alternativos para dietas de equinos no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, p. 232-241, 2011.

GAO, W. CHAN, Y., YOU, M., LACAP-BUGLER C. D., KEUNG, L. W., RORY M. W., In-depth snapshot of the equine subgingival microbiome, **Microbial Pathogenesis**, v.94, p.76-89, 2016.

GERE, I., and DIXON, P.M. Post mortem survey of peripheral dental caries in 510 Swedish horses. **Equine Vet. J.** v. 42, p. 310-315, 2010.

GENRO, T. C. M.; ORQIS, M. G. **Informações básicas sobre coleta de amostras e principais análises químico-bromatológicas de alimentos destinados à produção de ruminantes**. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2008. v. 1, p. 10-12.

GIBBONS, R. J. et al. Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming streptococci of human origin. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 11, p. 549-560, 1966.

GUGGENHEIM, B. Streptococci of dental plaques. **Caries Research**, Basel, v. 2, p. 147-163, 1968.

GROSS, E. L. et al. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, art. 47722, 2012.

HANNIG, M.; JOINER, A. The structure, function and properties of the acquired

pellicle. In: DUCKWORTH, R. (Ed.). **The teeth and their environment**. Basel: Karger, 2006. p. 29-64.

HANNIG, C. et al. Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 52, p. 1048-1056, 2007.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 5, p. 446, 2003.

HORBAL, A., SMITH, S., DIXON, P.M. A Computed Tomographic (CT) and Pathological Study of Equine Cheek Teeth Infundibulae Extracted From Asymptomatic Horses. Part 1: Prevalence, Type and Location of Infundibular Lesions on CT Imaging. **Front Vet Sci**. v. 6: p.124, 2019.

HOSHINO, T.; KAWAGUSHI, M.; SHIMIZU, N.; HOSHINO, N.; OOSHIMA, T.; FUJIWARA, T. PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gff* genes. **Diagn. Microb. Infect. Dis.**, v.48: p.195-199, 2004.

JACKSON, K., KELTY, E. and TENNANT, M. Equine peripheral dental caries: an epidemiological survey assessing prevalence and possible risk factors in Western Australian horses. **Equine Vet. J.** v. 50, p. 79-84, 2018.

JACKSON, K.; KELTY, E.; TENNANT, M. Peripheral caries and disease of the periodontium in Western Australian horses: an epidemiological, anatomical and histopathological assessment. **Equine Vet J**, London, v. 51, p. 617-624, 2019.

KARPINSKI, T. M.; SZKARADKIEWICZ, A. K. Microbiology of dental caries. **Journal of Biology and Earth Sciences**, Suchy Las, v. 3, p. 44-49, 2013.

KENNEDY, R., LAPPIN, D.F., DIXON, P.M., Buijs, M.J., ZAURA, E., CRIELAARD, W., O'DONNELL, L., BENNETT, D., BRANDT, B.W. and RIGGIO, M.P. The microbiome associated with equine periodontitis and oral health. **Vet. Res.** v. 47, p. 49, 2016.

KLEINBERG, I. A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and specific plaque hypothesis. **Crit Rev Oral Biol Med.** v.13, p. 108-25, 2002.

KIANOUSH, N. et al. Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, art. 92940, 2014.

KLIGLER, I. J.; GIES, W. J. A biochemical study and differentiation of oral bacteria, with special reference to dental caries. **Journal of the Allied Dental Societies**, New York, v. 10, p. 445, 1915.

KILIC, S., DIXON, P.M. and KEMPSON, S.A. A light microscopic and ultrastructural examination of calcified dental tissues of horses: 4. Cement and the amelocemental

junction. **Equine Vet. J.** v.29, p.213- 219, 1997.

LANDELL, M. G. de A. **A variação IAC86-2480 como nova opção de cana-de-açúcar para fins forrageiros**: manejo de produção de uso na alimentação animal. Campinas: Instituto Agrônomo, 2002. 39 p. (Série Tecnológica APTA. Boletim Técnico IAC, 193).

LEWIS, Lon D. **Nutrição clínica eqüina: alimentação e cuidados**. Roca, 2000.

LUNDSTRÖM, T. S.; DAHLEN, G. G.; WATTLE, O. S. Caries in the infundibulum of the second upper premolar tooth in the horse. **Acta Veterinaria Scandinavica**, London, v. 49, p. 10, 2007.

LUNDSTRÖM, T. BIRKHED, D. Equine peripheral cemental defects and dental caries: four case reports. **Equine Vet Educ**, 2020.

MARSH PD. Role of the oral microflora in health. *Microb. Ecol. Health Dis.*, v.12: p.130-137, 2000.

MEYER, Helmut; HAGEN, Stéfano. **Alimentação de cavalos**. Livraria Varela, 1995.

MILLER, W.D. Die Mikroorganismen der Mundhöhle. **Georg Thieme, Leipzig**.1889.

PIMENTEL, M. M. et al. Manejo nutricional de equinos utilizados em provas de vaquejada no rio grande do norte, Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 7, p. 61-65, 2013.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 115-130.

Ramzan, P.H.L. & Palmer, L. The incidence and distribution of peripheral caries in the cheek teeth of horses and its association with diastemata and gingival recession. **Equine Vet J.** v.190, p. 90-93, 2011.

SANTOS, C. M. et al. Influência da utilização de aditivos químicos no perfil da fermentação, no valor nutritivo e nas perdas de silagens de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 1555-1563, 2008.

SANTOS, F. F. et al. Identificação da microbiota da cavidade oral de equinos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, Umuarama, v. 17, p. 27-30, 2014.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos**: métodos químicos e biológicos. 3 ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2005. 235 p.

SIQUEIRA, J. F.; RÔÇAS, I. N. As-yet-uncultivated oral bacteria: breadth and association with oral and extra-oral diseases. **Journal of Oral Microbiology**, Jarfalla, v. 5, p. 21-37, 2013.

SCHEIUNERT, A. & TRAUTMANN, A. Zum Studium Speichel sekretion. L. Mitteilung. Uber die sekretion der Parotis des Pferdes. **Pftuigers Arch. ge8. Phy8iol.** v.192, p. 1-32, 1921.

TANZER, J.M. Microbiology of dental caries. In: Mosby Year Book, **Contemporary Oral Microbiology and Immunology**, Eds: J. Slots and M. Taubman, Mosby, StLouis. v.3, p 342- 372, 1992.

TEN CATE, J. M. Models and role models. **Caries Research**, Basel, v. 49, v. 12, suppl 1, p. 3-10, 2010.

TRAUB-DARGATZ, J. L.; SALMAN, M. D.; ROSS, J. L. Medical problems of adult horses as ranked by equine practitioners. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 198, p. 1745-1747, 1991.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

VANUSPONG, W., EISENBURGER, M. and ADDY, M. Cervical tooth wear and sensitivity: erosion, softening and rehardening of dentine; effects of pH, time and ultrasonication. **J. Clin. Periodontol.** v. 29, p. 351- 357, 2002.

VIEIRA, M. C. **Percepções de práticas de manejo em estabelecimentos equestres quanto à influência dessas práticas para o bem-estar de equinos**. 20 f. Dissertação (Mestrado ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

WINDLEY, Z., WELLER, R., TREMAINE, W.H. and PERKINS, J.D. Two- and three-dimensional computed tomographic anatomy of the enamel, infundibulae and pulp of 126 equine cheek teeth. Part 2: findings in teeth with macroscopic occlusal or computed tomographic lesions. **Equine Vet. J.** v.41, p.441- 447, 2009.

YANG F, ZENG X, NING K, LIU KL, LO CC, WANG W, CHEN J, WANG D, HUANG R, CHANG X, CHAIN PS, XIE G, LING J and XU J. Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. **ISME J.** p. 1-10, 2012.

Zago, C.P. Cultura do sorgo para produção de silagem de alto valor nutritivo. In: **Simpósio Sobre Nutrição de Bovinos**. Fundação de Estudos Agrários "Luiz de Queiroz", Piracicaba,v.1, p. 169-217, 1991.