

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DE OSSOS AUTOCLAVADOS SOBRE A REMOÇÃO DE
CÁLCULO DENTÁRIO, IMPACTO SOBRE O PERIODONTO E ESMALTE
DENTÁRIO DE CÃES ADULTOS**

CAROLINE FREDRICH DOURADO PINTO
Zootecnista/UFRRJ

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia
Área de concentração Produção Animal

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2019

CIP - Catalogação na Publicação

Fredrich Dourado Pinto, Caroline
AVALIAÇÃO DE OSSOS AUTOCLAVADOS SOBRE A REMOÇÃO DE
CÁLCULO DENTÁRIO, IMPACTO SOBRE O PERIODONTO E ESMALTE
DENTÁRIO DE CÃES ADULTOS / Caroline Fredrich Dourado
Pinto. -- 2019.
68 f.
Orientador: Luciano Trevizan.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. itens mastigatórios. 2. saúde oral canina. 3.
dentes. I. Trevizan, Luciano, orient. II. Título.

Caroline Friedrich Dourado Pinto
Zootecnista

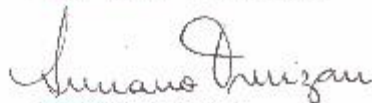
DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do grau de

MESTRE EM ZOOTECNIA

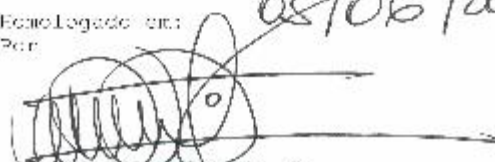
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 18/03/2018
Pela Banca Examinadora



LUCIANO TREVISAN
BEC Zootecnia/UPRSB
Orientador

Homologado em:
Por

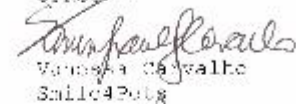


20/10/2018

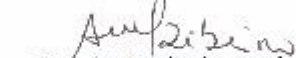
CARLOS ALBERTO BISSANI JR.
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia



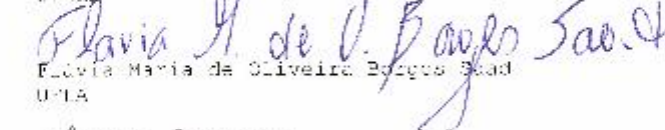
Fabio Ritter Marx
UPROS



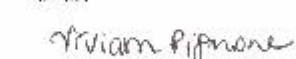
Vanessa Cavalho
Smilc@Pots



Andréa Machado Leal Ribeiro
UPRSB



Flavia Maria de Oliveira Borges Saad
UPRA



Viviam Nunes Pignone
ALLPet Cooop.º



CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

“It always seems impossible until it’s done.” – Nelson Mandela

DEDICO

À minha mãe **Mirla Luiza Fredrich Dourado**, sem o seu apoio e amor incondicional nada disso seria possível.
Ao meu irmão **Everton Fredrich Dourado Pinto**, e aos meus queridos companheiros **Clodoaldo, Julie e Felix**.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, **Mirla Luiza Fredrich Dourado**, sem a qual esta trajetória não seria possível. Sou eternamente grata pelo conforto e estímulo durante os momentos mais difíceis ao longo do mestrado.

Ao meu irmão, **Everton Fredrich Dourado Pinto**, e família pelo incentivo e amor.

Aos meus amados companheirinhos **Clodoaldo, Julie e Félix**, motivos da minha intensa curiosidade e interesse por animais de companhia.

Ao meu amigo **Rodrigo Lucas Justino**, pela mais sincera amizade e apoio nos bons e maus momentos. Agradeço à Rural por ter nos unido.

Ao meu orientador, **Luciano Trevizan**, por todo o auxílio prestado durante o experimento e a redação da dissertação.

Às amigas da pós-graduação **Carolina Schell, Graciele Schirmann e Mariana Ribas**. Gúrias sensacionais que carinhosamente me acolheram e me fizeram sentir em casa.

Aos amigos estagiários do Laboratório de Ensino Zootécnico **Fernanda, Brenda, Giovane, Willian, Lauro, Jéssica, Carlos, Danrley, Gustavo, Rodrigo e Bruna**, os quais tive o prazer de “cuidar” por 1 ano e 5 meses. Os nossos mates do dia-a-dia e churrascos ficarão pra sempre na minha lembrança.

Aos mais queridos parceiros de trabalho, **Peppa, Nina, Adele, Tina, Duda, Pandora, Ozzy, Eddie, Remmy, Bruce, Bono e Yuri**. Fundamentais para a execução do experimento e, sem dúvidas, motivos da minha alegria diariamente.

Aos técnicos do Laboratório de Ensino Zootécnico (LEZO) pelo suporte durante os manejos diários e experimentais ao longo destes 2 anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida.

AVALIAÇÃO DE OSSOS AUTOCLAVADOS SOBRE A REMOÇÃO DE CÁLCULO DENTÁRIO, IMPACTO SOBRE O PERIODONTO E ESMALTE DENTÁRIO DE CÃES ADULTOS¹

Autor: Caroline Fredrich Dourado Pinto

Orientador: Prof. Dr. Luciano Trevizan

RESUMO

O presente estudo avaliou a incidência de lesões dentárias em cães adultos alimentados com ossos autoclavados de diferentes densidades. Doze cães Beagle adultos saudáveis (6 machos e 6 fêmeas, 4 anos de idade, $12,7 \pm 1,67$ kg PC) foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos: osso compacto (OC) ou osso esponjoso (OE) por 14 dias. Os cães receberam um alimento extrusado duas vezes por dia para atender à exigência energética de manutenção diária ($NEM = 130 \times kg^{0,75}$). Os dentes de todos os cães foram radiografados nos dias 0 e 14, e fotografias das arcadas dentárias foram capturadas nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 14. Ambos os tipos de ossos foram visivelmente efetivos na redução de cálculos dentários (CD) após 3 dias de suplementação (69,6% OE vs. 47,2% OC), porém as diferenças entre os tipos de ossos foram observadas apenas a partir do dia 9 (87,5% OE vs. 75,3% OC) até o dia 14 (92,8% OE vs. 80,8% OC), com efetividade superior nos dentes pré-molares e molares, seguido pelos caninos. Não foram observadas fraturas em raízes e esmalte dentários, nem alterações no trato gastrointestinal dos animais decorrente do consumo de ossos. As lesões se restringiram à gengiva e foram brandas, associadas apenas ao grupo OE (n=7). As lesões foram decorrentes do trauma promovido pela mastigação intensa e contínua dos ossos. Neste mesmo grupo, foi observado resquícios de ossos entre os dentes em dois cães, fato negativo a ser considerado. Devido à porosidade e menor densidade dos OE os cães puderam quebrar pequenos pedaços que ficaram retidos entre os dentes, o que pode gerar lesões dentárias. Os resultados demonstram que a suplementação com OE e OC foi altamente eficaz na remoção de CD. A suplementação com ossos de forma contínua, por 20 horas durante 13 dias sucessivos implicou em lesões gengivais devido ao esforço empregado na mastigação, fato que também ocorre com a mastigação contínua de outros itens mastigatórios e, até mesmo, brinquedos podem promover injúrias ao tecido gengival. A porosidade apresentada pelos OE em comparação aos OC parece ser a mais adequada para a limpeza do CD. Assim, o uso de ossos, em período similar ao avaliado, propositando a remoção de CD é uma alternativa eficaz na manutenção da saúde oral canina, prolongando o intervalo entre as limpezas periodontais. Cuidado especial deve ser dado após a suplementação de OE. A verificação de pedaços presos entre os dentes é importante, fato que mantém a profilaxia odontológica como uma prática necessária.

Palavras-chave: itens mastigatórios, saúde oral canina, dentes

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (68p.), Março de 2019.

EVALUATION OF AUTOCLAVED BONES ON DENTAL CALCULUS REMOVAL, IMPACT ON PERIODONTUM AND DENTAL ENAMEL OF ADULT DOGS¹

Author: Caroline Fredrich Dourado Pinto

Advisor: Prof. Dr. Luciano Trevisan

ABSTRACT

The present study evaluated the incidence of dental lesions in adult dogs fed with autoclaved bones of different densities. Twelve healthy adult Beagle dogs (6 males and 6 females, 4 years old, 12.7 ± 1.67 kg BW) were distributed in a completely randomized design with two treatments: compact bone (CB) or spongy bone (SB) for 14 days. The dogs received an extruded commercial food twice a day to meet the energy requirement of daily maintenance ($NEM = 130 \times BW^{0.75}$). The teeth of all dogs were x-rayed on days 0 and 14, and photographs of dental arches were captured on days 0, 3, 6, 9, 12 and 14. Both types of bone were visibly effective in reducing dental calculus (DC) after 3 days of supplementation (69.6% SB vs. 47.2% CB), but differences between bone types were observed only from day 9 (87.5% SB vs. 75.3% CB) until day 14 (92.8% SB vs. 80.8% CB), with superior effectiveness in the premolar and molar teeth, followed by canines. No fractures were observed in dental roots and enamel, nor any changes in the gastrointestinal tract of the animals due to bone consumption. The lesions were restricted to the gingiva and were mild, associated only to the SB group ($n = 7$). The lesions were due to the trauma caused by intense and continuous mastication of bones. In the same group, bone remnants were observed between the teeth in two dogs, a negative fact to be considered. Due to the porosity and lower density of SB, the dogs were able to break small pieces that were retained between the teeth, which can lead to dental injuries. The results demonstrate that SB and CB supplementation was highly effective in DC removal. Continuous bone supplementation for 20 hours for 13 consecutive days resulted in gingival injuries due to the effort used in mastication, a fact that also occurs with the continuous chewing of other masticatory items and even toys can promote gingival tissue injuries. The porosity presented by SB compared to CB seems to be the most adequate for cleaning DC. Thus, the use of bones, in a similar period to the one evaluated, aiming the removal of DC is an effective alternative in the maintenance of canine oral health, prolonging the interval between periodontal cleanings. Special care should be given after SB supplementation. The verification of pieces retained between the teeth is important, a fact that maintains dental prophylaxis as a necessary practice.

Key words: chewing items, canine oral health, teeth

¹ Master of Science dissertation in Animal Science – Faculdade de Agronomia, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (68 p.), March of 2019.

Sumário

CAPÍTULO I	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Anatomia dental e oral em cães.....	17
2.2. Periodontite canina	18
2.3. Microbiota oral	21
2.4. Lesões traumáticas aos dentes e estruturas de suporte.....	22
2.5. Métodos alternativos à redução de placas e cálculos	24
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS	26
CAPÍTULO II	27
Evaluation of teeth injuries caused by autoclaved beef bones used as chewing item to remove dental calculus	28
Abstract	29
Introduction	30
Materials and methods	32
Results	36
Discussion	43
Conclusions	48
Acknowledgement	49
References	49
CAPÍTULO III	54
CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
APÊNDICES	62
VITA	68

RELAÇÃO DE TABELAS

		Página
CAPÍTULO I		
Tabela 1.	Classificação da periodontite de acordo com os sinais clínicos e lesões evidenciados.	20
CAPÍTULO II		
Tabela 1.	Presença de cálculo dentário (%) em cães adultos recebendo dois tipos diferentes de ossos.	37
Tabela 2.	Lesões dentárias em cães adultos após suplementação com ossos de diferentes densidades por 13 dias.	42

RELAÇÃO DE FIGURAS**CAPÍTULO I**

Figura 1. Esquema ilustrativo das estruturas dentárias.

Página**17****CAPÍTULO II**

Figura 1. Sistema TRIDAN modificado para classificação de dentes de cão.

34

Figura 2. Arcada dentária esquerda do mesmo cão nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 14 após suplementação diária com osso compacto autoclavado.

37

Figura 3. Arcada dentária esquerda do mesmo cão nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 14 após suplementação diária com osso esponjoso autoclavado.

38

Figura 4. Efeito de diferentes tipos de ossos na remoção de cálculo dentário ao longo do período de tratamento em cães adultos.

39

Figura 5. Efeito do tempo na remoção de cálculo dentário ao longo do período de tratamento em cães adultos recebendo diferentes tipos de ossos.

41

Figura 6. Imagens indicando lesões dentárias em cães adultos após suplementação diária com ossos com diferentes densidades.

42

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

101	Primeiro incisivo superior direito
102	Segundo incisivo superior direito
103	Terceiro incisivo superior direito
104	Canino superior direito
105	Primeiro pré-molar superior direito
106	Segundo pré-molar superior direito
107	Terceiro pré-molar superior direito
108	Quarto pré-molar superior direito
109	Primeiro molar superior direito
110	Segundo molar superior direito
201	Primeiro incisivo superior esquerdo
202	Segundo incisivo superior esquerdo
203	Terceiro incisivo superior esquerdo
204	Canino superior esquerdo
205	Primeiro pré-molar superior esquerdo
206	Segundo pré-molar superior esquerdo
207	Terceiro pré-molar superior esquerdo
208	Quarto pré-molar superior esquerdo
209	Primeiro molar superior esquerdo
210	Segundo molar superior esquerdo
301	Primeiro incisivo inferior esquerdo
302	Segundo incisivo inferior esquerdo
303	Terceiro incisivo inferior esquerdo
304	Canino inferior esquerdo
305	Primeiro pré-molar inferior esquerdo
306	Segundo pré-molar inferior esquerdo
307	Terceiro pré-molar inferior esquerdo
308	Quarto pré-molar inferior esquerdo
309	Primeiro molar inferior esquerdo
310	Segundo molar inferior esquerdo
311	Terceiro molar inferior esquerdo
401	Primeiro incisivo inferior direito
402	Segundo incisivo inferior direito
403	Terceiro incisivo inferior direito
404	Canino inferior direito
405	Primeiro pré-molar inferior direito
406	Segundo pré-molar inferior direito
407	Terceiro pré-molar inferior direito
408	Quarto pré-molar inferior direito
409	Primeiro molar inferior direito

410	Segundo molar inferior direito
411	Terceiro molar inferior direito
OC	Osso compacto
OE	Osso esponjoso

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

As afecções orais são distúrbios frequentes em cães, em especial a periodontite. Inúmeros fatores contribuem para a sua ocorrência, dentre os quais destacam-se os de caráter genético, microbiológico, comportamental, ambiental e sistêmico. Embora a deposição de placa sobre a superfície dentária seja a causa primária, a soma de outros fatores como má oclusão e sobreposição dentária, alimentação pouco abrasiva e falta de higiene oral facilitam a acumulação da placa dentária (Harvey, 1998).

A periodontite é caracterizada inicialmente pela deposição de um biofilme glicoproteico secretado por bactérias específicas formando placas sobre a superfície dentária, em um consórcio muito bem organizado entre a disponibilidade de substratos e microrganismos presentes no local. Bactérias aeróbias gram-positivas e anaeróbias facultativas proliferam e produzem um biofilme sobre a superfície dentária, e à medida que ocorre o engrossamento deste biofilme forma-se um microambiente anaeróbico suscetível a instalação e proliferação de bactérias anaeróbias gram-negativas. Carbonatos e fosfatos de cálcio presentes na saliva são depositados sobre a placa produzindo os cálculos dentários. A persistência da placa, de bactérias anaeróbias e de seus produtos promovem a inflamação e ativação da resposta imune do hospedeiro iniciando assim a periodontite (American Academy of Periodontology, 1999; Hardham et al., 2005). A acumulação da placa dentária leva à gengivite, que se não tratada resulta na inflamação do periodonto culminando com a perda da adesão tecidual, destruição da ligação entre o tecido conectivo e o osso (Harvey, 1998).

O controle da placa dentária ainda nos estágios iniciais impede a progressão da afecção garantindo a manutenção da saúde oral e promoção do bem-estar animal. Uma das maneiras de reduzir a progressão e acumulação de placa e, assim, retardar o desenvolvimento da periodontite, se dá através da escovação periódica (Harvey et al., 2015) ou pela manipulação dietética, seja mediante inclusão de aditivos específicos (polifosfatos de sódio) (Stookey et al., 1996; White & Gerlach, 2000; Carciofi et al., 2007; Paiva et al., 2007; Pinto et al., 2008) ou pelo fornecimento de alimentos abrasivos que estimulem a mastigação, uma vez que o atrito é capaz de remover placas aderidas à superfície dentária (Quest, 2013).

Alguns estudos evidenciam a atuação positiva de objetos mastigatórios sobre a redução de cálculos dentários, através da inclusão de petiscos (Fujita et al., 2008) ou ossos (Marx et al., 2016). Apesar dos benefícios associados ao consumo de ossos sobre a redução de cálculos, a possível ocorrência de lesões dentárias e acidentes ingestivos impedem a sua disseminação no manejo alimentar de animais de companhia. As lesões podem acometer os tecidos dentais duros e polpa, tecidos periodontais, ossos de sustentação, gengiva ou mucosa (Gracis and Orsini, 1998). Em cães e gatos, incisivos e caninos maxilares são mais comumente afetados (Spodnick, 1992; Wiggs & Lobprise, 1997). Adicionalmente, em cães, traumas no quarto pré-molar superior e molar, dentes carnissais, são comuns devido à força desempenhada no ato mastigatório principalmente de itens duros como ossos.

Com vistas em entender os efeitos do oferecimento de ossos sobre a saúde oral dos cães esta dissertação foi redigida e dividida em 3 capítulos: O capítulo 1 aborda os conceitos relacionados à estrutura e função dos dentes, o desenvolvimento de placa, cálculo e periodontite, e a atuação da microbiota oral sobre estes eventos. O capítulo 2 inclui um estudo com dois tratamentos em que se avaliou o efeito do fornecimento de partes distintas do fêmur bovino autoclavado na remoção de cálculos dentários e seu impacto sobre a formação de lesões dentais e orais. O capítulo 3 apresenta as considerações finais da dissertação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Anatomia dental e oral em cães

Os dentes são estruturas localizadas nos alvéolos dos ossos incisivos, do osso mandibular e maxilar, estando os superiores (maxilares) projetados ligeiramente a frente dos inferiores (mandibulares). Os cães são classificados como heterodontes, os dentes possuem formatos e tipos diferentes, e difiodontes, pois em condições normais se desenvolvem dois tipos de dentição: a primária (decíduos) e a secundária (permanentes). Os cães nascem edentados e a erupção dos dentes decíduos varia de acordo com o indivíduo, mas de modo geral se inicia com um mês de idade, com um ordenamento na sequência de erupção. Os dentes são divididos em: incisivos, caninos e genianos (pré-molares e molares). Os cães possuem 28 dentes decíduos [2(Incisivos 3/3, Caninos 1/1, Pré-molares 3/3)=28] e 42 dentes permanentes [2(Incisivos 3/3, Caninos 1/1, Pré-molares 4/4, Molares 2/3)=42]. Diferentes funções são atribuídas aos dentes de acordo com a sua morfologia: os incisivos têm como função a apreensão dos alimentos, os caninos a função de prender e rasgar, os genianos são responsáveis pela mastigação (Wiggs e Lobprise, 1997; Román, 1999).

Os dentes são compostos por coroa, colo e raiz (Figura 1). A coroa é a parte visível do dente, que sobressai da gengiva, e é coberta pelo esmalte. A raiz é a porção revestida pela gengiva, dentro do alvéolo dentário, recoberta por um tecido conectivo calcificado nomeado cimento. De acordo com a localização anatômica o dente pode possuir de uma a três raízes, sendo assim classificado como uni-, bi- ou trirradicular. A união entre a coroa e a raiz compõe o colo (Román, 1999; Gioso, 2007; Roza, 2012).

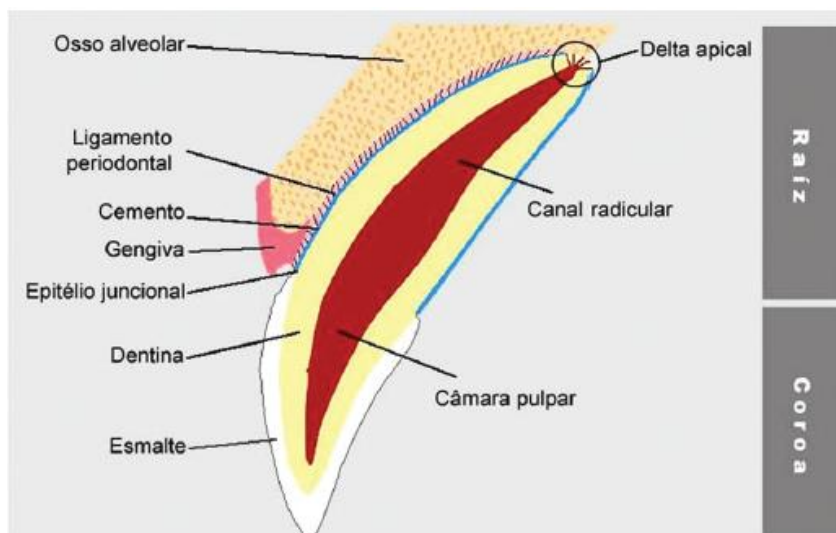


Figura 1. Esquema ilustrativo das estruturas dentárias. Fonte: Gioso, 2007.

O esmalte que recobre a coroa dentária é composto por 98% de elementos inorgânicos a base de hidroxapatita, composição que confere dureza e proteção à superfície do dente. Não existe capacidade regenerativa ou reparadora. O cimento, tecido conjuntivo calcificado, é responsável pela

sustentação do dente em seu alvéolo e não possui vascularização, mas apresenta capacidade de reparação e reabsorção. Estrutura de extrema importância para a reparação das superfícies radiculares, manutenção dos espaços periodontais e fibras do ligamento periodontal. A dentina, o principal componente do dente, é constituída por um tecido conectivo calcificado. Esta é recoberta por esmalte e cemento na coroa e na raiz, respectivamente (Román, 1999; Gorrel, 2010; Roza, 2012). Os tecidos duros (esmalte, cemento e dentina) estão sujeitos a alterações metabólicas tóxicas e infecciosas, sendo assim locais de risco a injúrias.

Os dentes se conectam aos alvéolos dentais por um tecido conectivo denso especializado, denominado membrana periodontal, composta por fibras colágenas que se estendem do osso ao cemento. A membrana proporciona a união do dente ao osso, além de amortecer parte dos impactos produzidos pela mastigação. Por último, a mucosa da boca forma um revestimento externo do osso, a gengiva, através da ligação ao epitélio juncional, que quando íntegro apresenta-se aderido apenas ao esmalte. A gengiva possui duas configurações, livre e aderida, a primeira possui o sulco gengival entre ela e os dentes. No sulco gengival são liberados os mediadores pró-inflamatórios que conferem proteção ao epitélio juncional e tecidos profundos (Román, 1999; Robinson, 2002; Gioso, 2007; Roza, 2012).

As estruturas que conferem proteção, sustentação e que, portanto, recobrem parcialmente os dentes, constituem o periodonto. O periodonto é composto por gengiva, cemento, osso alveolar e ligamento periodontal (Harvey, 1998). O osso alveolar é uma projeção cônica dos ossos da maxila e mandíbula que envolve os dentes, é uma estrutura vascularizada e inervada. O ligamento periodontal é composto por fibras de tecido conjuntivo fibroso, com formação de colágeno nomeadas fibras de Sharpey, é um tecido resistente e elástico que possui função de unir o dente ao osso alveolar (Gioso, 2007; Roza, 2012). Diante da importância destas estruturas no suporte e proteção dos dentes, a inflamação destes tecidos progressivamente promove a perda de adesão periodontal e do suporte ósseo (Williams, 1990).

2.2. Periodontite canina

A periodontite é a doença oral mais diagnosticada em animais de companhia, com prevalência estimada entre 44 a 64% da população canina (Hamp et al., 1984; Butkovic et al., 2001; Kyllar and Witter, 2005; Kortegaard et al., 2008), compreendendo uma série de doenças inflamatórias no periodonto, sendo a principal responsável pela mobilidade e perda dentária (West-Hyde and Floyd, 1995). O desenvolvimento da afecção é afetado por diversos fatores, como raça, idade, dieta, mastigação e saúde geral do animal. Estudos epidemiológicos indicaram maior prevalência com a idade (Kortegaard et al., 2008) e em raças de pequeno porte (Harvey et al., 1994), porém o principal agente etiológico é a placa na superfície dentária (Van Dyke and Dave, 2005).

A placa é uma substância mole, estruturada e resistente, que se adere fortemente ao esmalte dos dentes (Harvey, 1998). Bactérias aeróbias gram-positivas (*Actinomyces* spp., *Streptococcus* spp.) naturalmente presentes na cavidade oral, denominadas colonizadoras, em contato com as proteínas e

polissacarídeos salivares produzem um biofilme glicoproteico sobre a superfície dentária (West-Hyde and Floyd, 1995).

A proliferação e acúmulo de placa cria um microambiente anaeróbico facultativo no sulco gengival favorável ao estabelecimento e proliferação de bactérias anaeróbias gram-negativas (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Tannerella forsythia*, *Treponema* spp.) (American Academy of Periodontology, 1999; Hardham et al., 2005).

Com a progressão da deposição de placa dentária junto à margem e no sulco gengival ocorre a instalação da gengivite, caracterizada pela formação de edema e, em alguns casos, sangramento da gengiva. A inflamação é reversível desde que o seu agente etiológico seja removido, neste caso a placa dentária. O acúmulo de placa, em conjunto com as bactérias ali presentes e seus metabólitos são cruciais para severidade da inflamação (Harvey, 1998; Róman, 1999; Niemiec, 2008a). Neste estágio não é possível mensurar com precisão a perda de adesão, pois o tecido inflamado facilita a passagem da sonda periodontal mesmo não configurando perda de adesão (Harvey, 1998).

A manutenção da placa é responsável pelo desenvolvimento da enfermidade com a formação de cálculos dentários, através da precipitação de sais de cálcio (carbonatos e fosfatos de cálcio) presentes na saliva permitindo a mineralização das placas dentárias (Harvey, 1998). O pH alcalino da saliva de cães (~7,5) favorece a mineralização e formação dos cálculos (Coignoul and Cheville, 1984; Harvey, 2005; Hale, 2009; Logan et al., 2010). Inicialmente o cálculo é depositado nas regiões próximas aos orifícios de drenagem dos ductos salivares, como região vestibular do quarto pré-molar e primeiro molar superior (proximidade com o local de saída dos ductos das glândulas parótidas e zigomáticas) e região vestibular do terceiro e quarto pré-molar inferior e primeiro molar inferior (proximidade com o local de saída dos ductos das glândulas sublinguais e mandibulares) (Román, 1999).

À medida que ocorre deposição de cálculos são formadas as bolsas periodontais, caracterizadas pelo aprofundamento do sulco gengival viabilizando o acúmulo de placa subgengival, que, posteriormente, mineraliza sobre a superfície das raízes. O aumento na profundidade das bolsas periodontais, normalmente de 1-3 mm em cães, reflete a perda de adesão e reabsorção tecidual e óssea (Niemiec, 2008a).

A transição de gengivite ao início da periodontite é de difícil determinação clínica. A nível celular é iniciado através do reconhecimento da presença de bactérias e seus metabólitos promovendo o recrutamento de neutrófilos e vasodilatação, bem como a ativação da resposta imune do hospedeiro, como os sistemas de complemento e quinina e as vias do ácido araquidônico (Kinane et al., 2003). Adicionalmente, lipopolissacarídeos de origem bacteriana estimulam monócitos e fibroblastos na síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela ativação de processos catabólicos, resultando na reabsorção óssea e destruição do colágeno (Ishikawa, 2007). Esta sequência de eventos inflamatórios é responsável pela destruição do periodonto (Teng, 2006).

Clinicamente, observa-se o aprofundamento das bolsas periodontais à medida que ocorre reabsorção óssea entre as raízes dos dentes trirradiculares formando um defeito denominado furca. A furca permite que o alimento e placa sejam depositados nestes espaços. A contínua reabsorção óssea pode ainda

possibilitar a formação de bolsas intraósseas, devido à reabsorção óssea irregular. O bolso palatino do dente canino em um cão grande pode atingir 12-15 mm de profundidade. A formação destas bolsas facilita a ocorrência de infecções, ocasionando um abscesso seguido de fistulação (Harvey, 1998).

Os dentes unirradiculares perdem adesão mais rapidamente comparado aos dentes bi e trirradiculares, produzindo maior mobilidade do dente no alvéolo. Eventualmente, a adesão é completamente perdida e o dente permanece na arcada somente porque os cálculos o sustentam. Neste momento, a adesão não pode ser restaurada, e a doença endodôntica pode ser iniciada caso o aporte sanguíneo seja interrompido demandando tratamento endodôntico para a extração do dente. Por último, pode ocorrer a esfoliação do dente seguida pelo término da inflamação. O processo é completado quando a gengiva ocupa o espaço vazio do alvéolo (Harvey, 1998).

A periodontite inicia-se, portanto, como um infiltrado inflamatório subjacente ao epitélio da margem gengival que se estende rapidamente pela gengiva marginal afetando o tecido conectivo. A alteração do status gengiva normal para inflamação aguda demonstra a elevada vascularização da área, sobre a qual se desenvolve uma resposta de células linfóides de imediato. A reabsorção e perda óssea ocorre na sequência, completando assim o conjunto de prejuízos promovidos ao animal, dos quais destacam-se a perda de epitélio aderido, ligamento periodontal e osso alveolar (Tabela 1).

Adicionalmente, a doença possui elevado potencial desencadeador de distúrbios sistêmicos, comprometendo órgãos como coração, fígado, rins e articulações (DeBowes et al., 1996; Pavlica et al., 2008).

Tabela 1. Classificação da periodontite de acordo com os sinais clínicos e lesões evidenciados.

Classificação	Evidências clínicas
Grau 1	Gengivite marginal produzida primariamente por falta de higiene, que leva a um acúmulo de placa. É reversível com procedimento de polimento.
Grau 2	Início de edema, tumefação dos tecidos da gengiva marginal e inflamação da gengiva aderida. Reversível com uma profilaxia total.
Grau 3	Edema associado à gengivite e início de formação de bolsas. O processo passa a ser denominado periodontite. Reversível nos estágios iniciais com profilaxia total, raspagem subgengival e tratamento de raízes.
Graus 4	Resposta inflamatória severa, formação de bolsas profundas, presença de líquido purulento, início de perda óssea e mobilidade dentária. Tratamento cirúrgico obrigatório.
Graus 5	Perda óssea avançada, formação de bolsa e mobilidade dentária. Tratamento cirúrgico obrigatório. Adicionalmente, a doença possui elevado potencial desencadeador de distúrbios sistêmicos, comprometendo órgãos como o coração, fígado, rins e articulações.

Adaptado de Román (1999).

2.3. Microbiota oral

A periodontite é uma doença multifatorial, porém a placa bacteriana é reconhecida como um importante fator promotor da afecção. A deposição de placa dentária é iniciada por bactérias gram-positivas aeróbias residentes habituais da cavidade oral canina, em uma relação de comensalismo. A etiologia específica da doença permanece desconhecida, embora alguns trabalhos atribuam às bactérias gram-negativas anaeróbias a alteração da relação de comensalismo para o caráter patogênico da doença (Hennet and Harvey, 1991).

A caracterização de populações bacterianas presentes na cavidade oral é de suma importância para a elucidação da etiologia da doença, contribuindo assim para o desenvolvimento de informações básicas vitais para a melhoria da saúde oral canina. Os primeiros estudos direcionados à identificação da microbiota relacionada a doenças orais utilizavam técnicas convencionais como o cultivo em placa (Baillie et al., 1978; Elliot et al., 2005; Hardham et al., 2005; Riggio et al., 2011; Dahlén et al., 2012). No entanto, o uso de métodos de cultura reduz a precisão dos resultados, uma vez que estas técnicas normalmente superestimam bactérias facilmente cultiváveis e subestimam outras de difícil cultivo, que poderiam estar altamente prevalentes no ambiente de origem (Wade, 2002).

O avanço nas técnicas de identificação foi possível devido a utilização do cão como modelo animal para compreensão da periodontite nos seus diversos aspectos: histológico, etiológico, clínico e terapêutico (Talbot, 1899; Gad, 1968; Lindhe et al., 1975; Sorensen et al. 1980). Com isso foi iniciada a implementação de metodologias até então dispensadas apenas ao reconhecimento da microbiota humana.

A utilização de técnicas independentes de cultura é mais apropriada para a caracterização da microbiota oral canina, com preferência atual ao uso da técnica de amplificação e sequenciamento bacteriano, conhecido como pirosequenciamento do gene 16S rDNA (Klindworth et al., 2013). Através da análise das sequências em softwares de bancos de dados é possível identificar o gênero das bactérias presentes no ambiente com elevada precisão (Quast et al., 2013).

Estudos recentes utilizando a técnica de sequenciamento permitiram identificar bactérias presentes nos diferentes estágios da periodontite, ressaltando a pressão que o ambiente oral proporciona na seleção dos microrganismos de acordo com a disponibilidade de recursos, como oxigênio, nutrientes, pH e fatores imunológicos (Davis et al., 2013).

Riggio et al. (2011) observaram predominância de *Pseudomonas* sp. (30,9% dos clones) na cavidade oral de cães livres de gengivite e periodontite. Flancman et al. (2018) também observaram aumento de *Pseudomonas* sp. após a profilaxia dentária. Arbitrariamente, Sturgeon et al. (2013) encontraram predominância de *Porphyromonas* spp. (39,2% das sequências) e *Fusobacterium* (4,5% das sequências), este último importante fator coagregador da placa dentária humana (Kolenbrander et al., 1989) evidenciando a associação de bactérias na patogênese da doença. Davis et al. (2013) encontraram *Porphyromonas* spp, *Moraxella* e *Bergeyella* na cavidade oral saudável.

A produção do biofilme bacteriano é o marco iniciador da periodontite, Holcombe et al. (2014) observaram a presença de diversos filos na placa dentária 24 horas após profilaxia, com prevalência de Proteobacteria (32,1%), Bacteroidetes (23,9%), Firmicutes (20,9%), Actinobacteria (14,9%) e Fusobacteria (6,0%). As espécies mais abundantes foram *Bergeyella zoohelcum*, *Neisseria shayeganii* e *Moraxella* sp.

Alguns grupos bacterianos possuem papel patogênico bem estabelecido, como *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Tannerella* e *Treponema* (Riggio et al., 2011; Davis et al., 2013). Em contraste ao elucidado para a placa dentária humana, em cães placas “saudáveis” são abundantes em bactérias gram-negativas, na periodontite ocorre a transição com a predominância de bactérias gram-positivas anaeróbias (Davis et al., 2013). Assim, os autores relataram a presença em abundância dos gêneros *Peptostreptococcus*, *Actinomyces* e *Peptostreptococcaceae* nos estágios iniciais da periodontite. Similarmente, Wallis et al. (2015) analisaram as mudanças na população bacteriana no período de transição de gengivite precoce aos estágios iniciais de periodontite. Os autores verificaram redução na proporção de bactérias gram-negativas aeróbias associadas à saúde, como *Bergeyella zoohelcum*, *Moraxella* sp., *Pasteurellaceae* sp. e *Neisseria shayeganii*, à medida que a periodontite progredia. Assim, os autores concluíram que a periodontite resulta de uma predominante sucessão bacteriana caracterizada por uma redução de um grupo de bactérias anteriormente abundante.

2.4. Lesões traumáticas aos dentes e estruturas de suporte

As lesões dentárias em cães e gatos são comumente oriundas de brigas com outros animais, quedas, acidentes veiculares e mastigação de objetos duros como pedras e ossos (Gracis and Orsini, 1998).

O impacto sofrido pelo dente e seus tecidos de sustentação resultam em fratura ou deslocamento do dente e separação ou compressão de tecidos de suporte como ligamento periodontal, osso e gengiva.

As lesões traumáticas aos dentes e estruturas de suporte podem ser classificadas de acordo com Andreasen (2000), em:

Fraturas de coroa

As fraturas de coroa são mais frequentes na dentição permanente, comprometendo os tecidos duros (esmalte e dentina) e, em acidentes mais graves, promovendo a exposição da polpa. O impacto sofrido é superior à força de cisalhamento do esmalte e da dentina, fazendo com que ocorra fratura do dente.

Fraturas de coroa-raiz

As fraturas de coroa-raiz são provenientes de impacto horizontal com rompimento e produção de um fragmento de coroa com mobilidade no local acometido pelo choque. As forças de cisalhamento dos tecidos duros são excedidas e ocorre a quebra do mesmo, envolvendo ou não a polpa. A fratura de coroa-raiz resulta em dor durante a mastigação, o tratamento evita inflamação na gengiva, polpa e ligamento periodontal pois evita a deposição de placa bacteriana sobre a linha da fratura.

Fratura de raiz

São provenientes de impacto frontal que desloca o dente em direção ao palato resultando em fratura na raiz e deslocamento do fragmento de coroa, o que desencadeia danos ao ligamento periodontal, polpa, cimento e dentina dificultando o processo de cicatrização.

Concussão e subluxação

Lesões por concussão são provenientes de um impacto frontal resultando em hemorragia e edema no ligamento periodontal. Em lesões por subluxação a força de impacto é amplificada fazendo com que as fibras do ligamento periodontal sejam rompidas, resultando em desprendimento, mas não em perda do dente lesionado.

Luxação extrusiva

São originadas de impactos oblíquos que desprendem o dente do seu alvéolo, o que impede a perda do dente lesionado são as fibras gengivais na face do palato que o sustentam. O impacto é responsável pelo rompimento do ligamento periodontal e do suprimento neurovascular da polpa.

Luxação lateral

O impacto horizontal desprende a coroa palatalmente e o ápice labialmente. Como na luxação extrusiva, as forças do choque são responsáveis pela quebra do ligamento periodontal e do suprimento neurovascular da polpa, bem como pela compressão do ligamento periodontal na face do palato da coroa. A luxação lateral promove ainda lesão do osso alveolar na face labial ou do palato.

Intrusão

Lesões por intrusão promovem a entrada do dente para o interior do processo alveolar devido ao direcionamento axial do impacto, o dano extenso sobre a polpa e periodonto, resultam em reabsorção radicular.

Avulsão

Impactos frontais provocam o deslocamento completo do dente de seu alvéolo, avulsão, devido danos excessivos sobre o ligamento periodontal e a polpa.

Fratura no processo alveolar

São lesões provenientes de impacto de extrema força sobre a região alveolar, envolvem dois ou mais dentes incitando o rompimento do ligamento periodontal e do suprimento neurovascular da polpa.

Traumatas por ação mecânica como mastigação intensa, também podem resultar em reabsorção com perda do ligamento periodontal e cimento no osso alveolar devido a atividade de odontoclastos geralmente na região cervical dental. A reabsorção começa no cimento, principalmente na região cervical, podendo ocasionar fratura da coroa de acordo com a severidade. Em cães, a

incidência de reabsorção ocorre com maior frequência no quarto pré-molar superior na linha gengival da superfície vestibular e no primeiro molar inferior na linha gengival da superfície lingual (Wiggs and Lobprise, 1997; Patel et al., 2009).

2.5. Métodos alternativos à redução de placas e cálculos

Os procedimentos padrões adotados para o controle das afecções orais são direcionados ao agente etiológico, visto isso a terapia periodontal consiste na remoção completa da placa e cálculos dentários. O plano terapêutico inclui a raspagem de cálculo supragengival, raspagem radicular do cálculo subgengival, aplainamento radicular, remoção de parte do cimento coberto por toxinas bacterianas, polimento e tratamentos específicos de acordo com o paciente (extrações, cirurgia periodontal, entre outros procedimentos) (Niemiec, 2008b).

A remoção completa das placas e cálculos é realizada com instrumentos manuais e mecânicos (curetagem e ultrassom, respectivamente), e ao término realiza-se o procedimento de polimento. Após a retirada de placas e cálculos criam-se irregularidades na superfície dentária que facilitam a adesão de novas placas comparado a uma superfície polida, desta forma o polimento é o procedimento padrão logo após a limpeza (Román, 1999).

Os cuidados dentais são essenciais na manutenção da saúde oral, pois retardam a deposição do biofilme bacteriano e a ocorrência da doença periodontal. A higiene oral canina pode ser alcançada através da adoção de hábitos rotineiros ao homem como a escovação diária dos dentes, método eficaz no controle de placa, cálculo e gengivite, além de reduzir a halitose (Harvey et al., 2015). No entanto, a prática diária dispense tempo e paciência para realização o que acaba desencorajando os tutores.

Frente a essas limitações cresce a demanda por métodos alternativos para redução de placas e cálculos dentários, em especial aqueles que estão associados à alimentação do animal, visto que a alimentação afeta diretamente dentes, ossos e a integridade da mucosa oral, além de influenciar a longevidade dos dentes.

As características físicas do alimento, como tamanho, forma e textura contribuem para a saúde oral, alimentos macios produzem menos atrito e assim desenvolvem mais placa comparado a alimentos secos (Watson, 1994; Gorrel, 1998; Logan et al., 2002). Entretanto, alimentos secos não são completamente eficazes na remoção de placa e cálculos, provavelmente devido ao hábito alimentar característico de carnívoros em não mastigar em demasido o alimento consumido.

A inclusão de polifosfatos, como hexametáfosfato e tripolifosfato, às rações ou petiscos promove efeitos significativos na redução de cálculos. Os fosfatos atuam como agentes quelantes do cálcio salivar reduzindo a disponibilidade para a mineralização da placa em cálculo (Stookey et al., 1996; White and Gerlach, 2000; Carciofi et al., 2007; Paiva et al., 2007; Pinto et al., 2008).

Atualmente, algumas empresas do segmento *pet food* tem direcionado um cuidado especial à elaboração de produtos promotores de saúde oral, na forma de palitos (*sticks*) destinados exclusivamente à estimulação da mastigação. O uso de itens mastigatórios auxilia na redução de placas e cálculos, além de controlar o mau hálito (Quest, 2013). Hennem et al. (2006) verificaram redução de

17,3% de placa e 45,8% de cálculo em cães de raça pequena que receberam palitos comestíveis diariamente.

O fornecimento de ossos foi uma prática comum até alguns anos atrás, mas tem sido abolida pela associação à incidência de fraturas e lesões dentárias, além de alguns ossos promoverem engasgo, perfuração visceral e formação de concreções esofágicas e intestinais (Gianella et al., 2009; Juvet et al., 2010; Thompson et al., 2012). Apesar de relatos negativos e ressalvas particulares, os ossos dispõem de características desejáveis em um item destinado exclusivamente à mastigação, como preço e disponibilidade acessíveis, fácil manipulação e eficácia na remoção de placas e cálculos dentários. Marx et al. (2016) observaram efetividade expressiva do fêmur bovino cru na redução de cálculos dentários após 3 dias de oferta consecutiva aos cães. A efetividade dos ossos no controle de placas e cálculos pode ser alcançada com a seleção de ossos resistentes que não quebrem facilmente e em tamanho suficientemente grande para evitar a deglutição pelo animal.

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

Hipóteses:

1. O fornecimento de ossos esponjosos ou compactos autoclavados auxilia na remoção de cálculos servindo na profilaxia oral dos cães;
2. O fornecimento de ossos esponjosos ou compactos autoclavados não promove lesões de esmalte e lesões de raízes podendo ser utilizado de forma segura sem prejuízos futuros a dentição dos cães.

Objetivo

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da textura dos ossos sobre a redução de cálculos dentários mediante o fornecimento de duas partes distintas do fêmur bovino autoclavado, diáfises e epífises, e impacto sobre o desenvolvimento de lesões dentárias e orais em cães adultos.

CAPÍTULO II

**Evaluation of teeth injuries caused by autoclaved beef bones used as
chewing item to remove dental calculus**

Este capítulo é apresentado de acordo com as normas de publicação da
PLOS ONE

**Evaluation of teeth injuries caused by autoclaved beef bones used as chewing item
to remove dental calculus**

**Caroline Fredrich Dourado Pinto^{1¶}, Willian Lehr^{1¶}, Viviam Nunes Pignone^{2¶},
Luciano Trevizan^{1*}**

¹Department of Animal Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
Rio Grande do Sul, Brazil¹

²AllPet Odonto, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil²

* Corresponding author

E-mail: ltrevizan@ufrgs.br (LT)

[¶]These authors contributed equally to this work.

Abstract

Presence of dental calculus is the most widespread oral problem in domestic dogs. The supply of chewing items allows the detachment of dental calculus from the tooth surface, as well as favors oral health and animal welfare. The use of raw beef bones to reduce dental calculus in adult dogs is effective only a few days after starting supplementation. The benefits of using bones as chewing items include easy handling, low cost, high availability in addition to promoting animal welfare. However, the fear of possible oral lesions occurrence remains a barrier to the dissemination of the item in the daily routine of pet owners. This study aims to evaluate the impacts of bones on dental roots, enamel and gingiva when it is used as a chewing agent to remove dental calculus in dogs. Twelve adult Beagle dogs were distributed in a complete randomized block design, with 2 treatments in which they received a piece of autoclaved bone with approximately 4 cm each, daily, for 13 days, been: cortical bone (CB) or spongy bone (SB). All dogs were submitted to intraoral radiographs on days 0 and 14, and calculus assessment was performed through images captured on days 0, 3, 6, 9, 12 and 14, and analyzed using an integration program to measure the proportion between area covered by calculus and total area of teeth. First and second premolars and molars from both arcades presented complete removal of dental calculus in less than 3 days after beginning supplementation, indicating greater use of these teeth for chewing ($P < 0.10$). Bones were highly effective items for dental calculus removal. Despite the hardness of the bones we noticed no lesions of fracture on the teeth roots and enamel, neither esophageal nor intestinal obstructions complications related to the bone ingestion. However, SB showed some lesions on the gingiva (n=4), bone remnants between teeth (n=2) and a tooth extraction (n=1) due to extensive bone resorption preexisting on day 0. Premolars and molars from both arcades were the teeth most affected, emphasizing its greater use for mastication. Gingival lesions

were the result of continuous offer of new piece of bone a day for 13 days. The same lesions can be found in dogs playing with toys. But, bone also clean teeth and it can be beneficial to the dog at the end because inflammation on the gingiva reduces after calculus reduction. The use of bones must be considered on oral home care program because remove more than 90% of calculus over the teeth in a short term, allowing longer intervals between periodontal cleaning procedures. Long term studies should be conducted in order to evaluate the use of bones, specially SB, in experimental periods greater than 13 days and thus to evaluate its impact on teeth and periodontium after prolonged supplementation.

Introduction

The pet food industry has been evolved for decades on promotion health and increasing longevity of companion animals. Thus, oral health has been discussed in recent years with greater intensity due to the high incidence of oral diseases related mainly to the consumption of foods that promote less abrasion to the dental surface thus providing the accumulation of dental plaques and calculus [1, 2, 3, 4]. These oral diseases directly interfere with health and life expectancy and may affect the function of organs such as heart, kidneys and liver [5, 6].

Periodontitis, the main oral disease occurring in up to 84% of the canine population over 3 years of age, has intrinsic factors such as prevalence in dogs of small breeds and progression with age [7]. Periodontitis is characterized as an inflammatory state, initiated by deposition of the microbial biofilm, mostly composed of bacteria, on the dental surface, known as plaque [8]. The dental plaque extends through the gingival sulcus and, if not removed, undergoes mineralization with calcium carbonates and

phosphates present in the saliva, causing the formation of dental calculus, the main cause of gingivitis. The condition produces irreversible damage in the tissues that provides recoating and support to the teeth such as gingiva, alveolar bone, cementum and periodontal ligament [9]. With progression, mobility and tooth loss occur, causing long-term damage to the dog affected.

Chewing items associated to the diet may modify plaque and calculus deposition [3, 9]. The addition of certain components such as sodium polyphosphates to diet and snacks is effective in the calculus control, since it acts as a chelator of salivary calcium preventing its mineralization and deposition on the dental surface [10, 11, 12, 13, 14], but seems like it is not effective to remove accumulated calculus. Physical properties of the diet (abrasiveness, texture and chewiness) should be considered in the food formulation as they play an important role in plaque control [9]. Allied to the food with its specific characteristics, for promoting oral health masticatory items (snacks, bovine skin treats, bones) can be used to the daily routine of dogs. Some authors have observed benefits to oral health in dogs that received masticatory items, mainly in the removal of dental calculus deposits [15, 16, 17].

Although some professionals and tutors had reservations regarding the occurrence of esophageal and intestinal obstructions and dental fractures, the use of bones to control dental calculus was effective in a study conducted by Marx et al. [18]. Authors evaluated two types of raw bones (cortical bone vs. spongy bone) and the results showed that the removal of large accumulations of calculus occurs in the first 3 days, with the spongy bone removing a higher percentage of calculus in a few days, also none complications associated with bone consumption were observed. However, the use of raw bovine bones had led to concerns about *Salmonella* contamination.

Bone consumption is common in wild animals, especially in diets of wolves, direct ancestor of domestic dogs [19, 20]. Kapoor et al. [21] observed a higher occurrence and severity of calculus and periodontal disease in captive animals that received only boneless ground meat than free-living animals. These findings emphasize the importance of the mechanical properties that food provides, directly contributing to the improvement of oral and systemic health of animals.

Previous studies have evaluated the calculus reduction in adult Beagle dogs by supplying raw beef bones but without diagnosing possible teeth lesions, especially those involving roots and bone associated to the teeth. Due to concerns about the use of raw bones, the objective of this study was to compare the effect of bovine autoclaved cortical bone (CB) from femur diaphysis with bovine autoclaved spongy bone (SB) from the femoral epiphysis, as agents to reduce dental calculus, and analyze its impacts on teeth roots and bone associated tissues, enamel and gingiva of adult Beagle dogs.

Materials and methods

All animal care and handling procedures were approved by The Institutional Animal Care and Use Committee at the Federal University of Rio Grande do Sul.

Animals and housing

Twelve healthy adult Beagle (6 males and 6 females) were used in this study. They were all intact, 4 years old, weighing 12.7 ± 1.67 kg, with a body condition score (BCS) ranging from 5.3 ± 0.4 out of 9 points [22] and free of endo- and ectoparasites. All dogs were regularly immunized and submitted to clinical and laboratory tests to measure complete blood count (CBC) and to perform biochemical and coproparasitological analyses before

the start studying. The dogs had never undergone professional dental cleaning and did not receive any regular tooth brushing or food containing entire bones and additives, such as sodium polyphosphates to prevent dental calculus accumulation.

During the study, the dogs were housed in individual stainless steel metabolic cages (1.0 × 1.0 × 1.5 m) equipped with a feces and urine collector, feeders, and drinkers, in a controlled room at 24°C and relative humidity at 70%, with a light:dark cycle of 14:10 h. They were fed twice a day with a non-dental dry extruded complete commercial diet to meet their daily maintenance energy requirements (130 kcal of metabolizable energy × body weight (kg)^{-0.75} day⁻¹) as recommended by NRC [23]. Water was provided *ad libitum* all the time.

Treatments

Raw bovine femur was supplied from a commercial slaughterhouse registered and inspected according to Brazilian national laws. The bones were cut using an electric band saw (Implemis IP55 – Santa Rosa, Rio Grande do Sul, Brazil) in order to obtain pieces of approximately 4 cm long of the diaphysis or epiphysis of bovine femur, representing the CB and SB, respectively. Bones were placed into the bags previously to the autoclave processing (Phoenix Luferco – Araraquara, São Paulo, Brazil), where it remained under 1.0 ATM, for 30 min, at 120°C. After autoclave, bones were stored at -18°C and thawed at room temperature before being offered to the dogs. The bones were offered every morning after the first meal, after removal of left overs provided the day before.

Experimental design

The dogs were divided in a completely randomized block design, consisting of 2 treatments, with 3 males and 3 female each, resulting in 6 replicates a minimum

recommended by AAFCO [24]. The treatments were composed by dogs receiving a piece of autoclaved CB or SB at each day for 13 consecutive days. They were kept in cages with bones during 20h/day and were taken to outdoor area to play for 4h/day.

Sample collection

The dogs were submitted to radiographs on days 0 and 14 in which the teeth were evaluated individually. Photographs from the lateral dental arches were taken on day 0, 3, 6, 9, 12 and 14.

Calculus assessment

Using the photographs, teeth were classified by quadrant in side (left or right), position (maxilla or mandibular) and type of teeth (incisors, canines, premolars, and molars). The teeth nomenclature used was the TRIDAN modified system [25] (Fig 1).

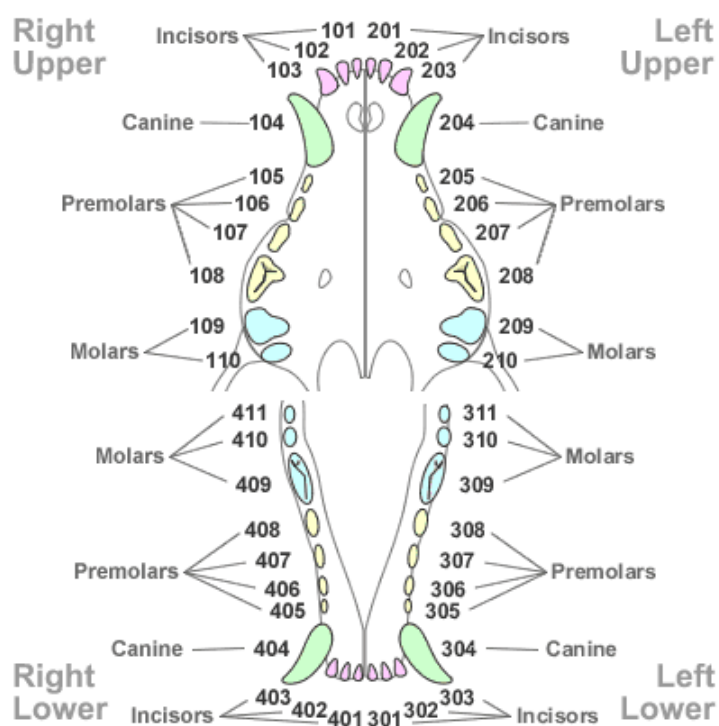


Figure 1. The TRIDAN modified system for dog teeth classification. Adapted from Crossley [26].

Images were obtained with a semi-professional camera fixed approximately 150 mm from the left and right sides of the dog's dental arches on days 0, 3, 6, 9, 12 and 14. The surface area of the teeth evaluated were the canines (104, 204, 304, 404), premolars 1-4 (105, 106, 107, 108, 205, 206, 207, 208, 305, 306, 307, 308, 405, 406, 407, 408) and molars 1-2 (109, 110, 209, 210, 309, 310, 409, 410) of all arcades. Images were analyzed by the Image-Pro® Plus software for Windows using the integration surface tool, adapted from Abdalla et al. [27]. Each image was integrated by drawing the outline area of each tooth evaluated, to calculate the dog's total dental arcade area. Next, each image was analyzed by only drawing the integrated teeth outline areas covered by calculus. Comparison of the total area and calculus-covered area was performed using the same images to determine the proportion of calculus related to the total area of tooth, similarly to Marx et al. [18].

Radiographs

Intraoral radiographs were performed on days 0 and 14, both conducted by a veterinarian dentistry. Previously to the procedure the dogs were anesthetized. The anesthetic protocol administered was: 0.03 mg/kg of acepromazine, 2 mg/kg of meperidine, 4 mg/kg of propofol and isoflurane at effect. The analyzed teeth were then individually radiographed (DIOX - 602 Portable X - ray System, DigiMed) with an intraoral sensor (Owandy Radiology).

Statistical analysis

The percentages of dental calculus along the treatment period were analyzed using the ANOVA procedure of SAS 9.4 (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Means were compared using Tukey's test at 5% probability ($P < 0.005$). The calculus reduction of each tooth over time were analyzed in panel, considering the animal over time. The effect of type of bone (CB or SB) was evaluated and regression equations were generated using Gretl 2018c for Windows and Microsoft® Office Excel 2010, and $P < 0.10$ was considered significant. Dental evaluations were analyzed by frequency in each treatment.

Results

The dogs presented high acceptability to the bones, showing interest immediately. The CB after 20 hours with dogs suffered minor alterations in the original conformation after chewing due to their higher density. All the CB had teeth marks with complete removal of the bone marrow, showing how bones are extremely palatable. The SB, due to their lower density, were reduced to smaller size than the original ones or were completely ingested by the dogs.

The presence of dental calculus was more concentrated in the premolar teeth (105, 106, 107, 108, 205, 206, 207, 208, 305, 306, 307, 308, 405, 406, 407, 408), molars (109, 110, 209, 210, 309, 310, 409, 410) and, finally, in the canines (104, 204, 304, 404). The relative area of calculus related to dental surface of the teeth observed in dogs assigned to CB treatment was 56.2% and 62.6% in SB treatment at day 0 (Table 1). There was a remarkable reduction of dental calculus in all teeth after exposition to the bones, but without significant differences between treatments until days 3 and 6 ($P > 0.05$).

The difference between bone types was showed from day 9, when the calculus accumulation was decreased on dogs belonging to the SB treatment ($P < 0.05$). In both groups the visualization of calculus reduction was possible since day 3 (Figs 2, 3),

highlighting the effectiveness of both types of bone in the removal of more coarse formations of dental calculus in the first days after supplementation had been started.

Table 1. Dental calculus presence (%) in adult Beagle dogs receiving two different types of beef bones.

Days	Treatments ¹		P-value	SEM ²
	Compact bone (%)	Spongy bone (%)		
0	56.2	62.6	0.4366	13.68
3	29.7	19.0	0.0936	9.97
6	21.8	12.0	0.0975	9.30
9	13.9 ^a	7.83 ^b	0.0490	4.42
12	11.9 ^a	5.45 ^b	0.0204	3.80
14	10.8 ^a	4.52 ^b	0.0119	3.32

¹ Numbers are the % of calculus covering teeth in each treatment

² SEM, standard error of the mean.

^a, ^b Different lowercase letters in the same row shows the difference between bones by Tukey test ($P < 0.05$).



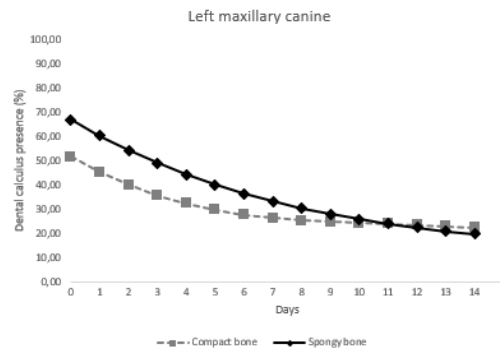
Figure 2. Left dental arcade of the same dog at days 0, 3, 6, 9, 12 and 14 (a-f, respectively) after daily autoclaved compact bone supplementation.



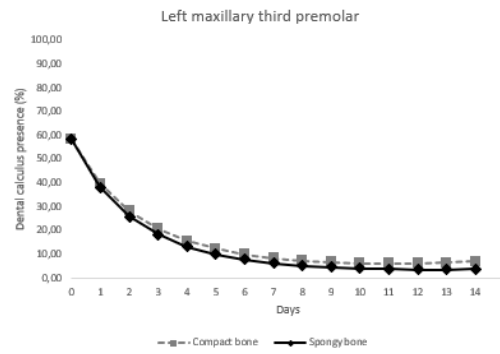
Figure 3. Left dental arcade of the same dog at days 0, 3, 6, 9, 12 and 14 (a-f, respectively) after daily autoclaved spongy bone supplementation.

Bone supplementation was effective in the complete removal of all calculus present on teeth 105,106,109, 205, 206, 305, 306, 309, 310, 405, 409 and 410 in less than 3 days after starting experimental period, making it unnecessary to analyze the calculus reduction over time in these teeth.

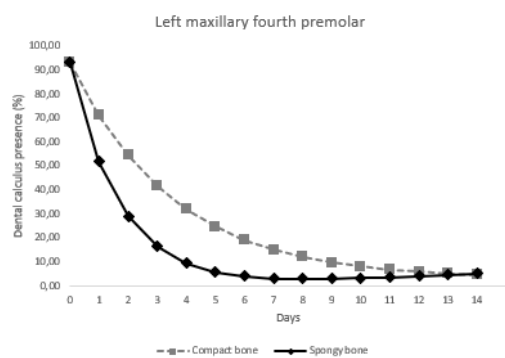
There was a treatment effect in the removal of calculus in the teeth 107, 108, 204, 207, 208, 307, 308, 407 and 408 (Fig 4), with greater SB effectiveness in the abrasion production on dental surface compared to CB.



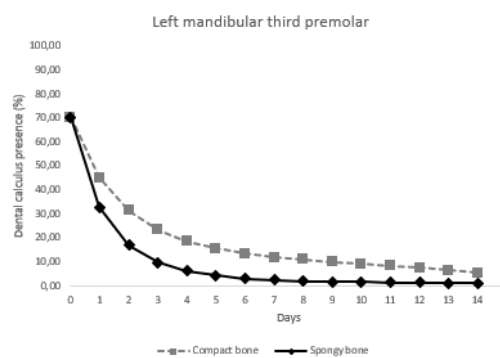
Regression equations generated are: Compact bone (grey broken line): $y = 51.8504 - 7.01183x + 0.614688x^2 - 0.0188482x^3$; Spongy bone (black solid line): $y = 67.089 - 7.01183x + 0.36103x^2 - 0.00726x^3$ ($r^2 = 0.984828$).



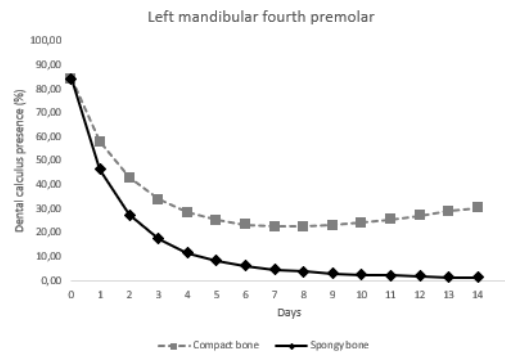
Regression equations generated are: Compact bone (grey broken line): $y = \exp(4.06703 - 0.397502x + 0.0175746x^2)$; Spongy bone (black solid line): $y = \exp(4.06703 - 0.52395x + 0.0175746x^2)$ ($r^2 = 0.544385$).



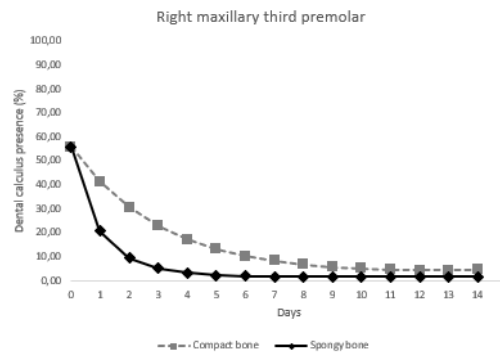
Regression equations generated are: Compact bone (grey broken line): $y = \exp(4.53525 - 0.269867x + 0.0301783x^2 - 0.00117873x^3)$; Spongy bone (black solid line): $y = \exp(4.53525 - 0.5864x + 0.04242x^2 - 0.00117873x^3)$ ($r^2 = 0.439411$).



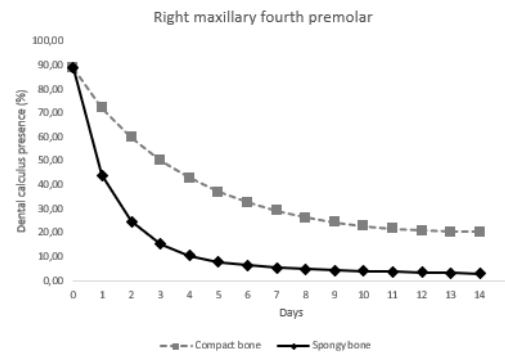
Regression equations generated are: Compact bone (grey broken line): $y = \exp(4.25391 - 0.484245x + 0.0446876x^2 - 0.00164261x^3)$; Spongy bone (black solid line): $y = \exp(4.25391 - 0.82281x + 0.06124x^2 - 0.00164261x^3)$ ($r^2 = 0.717337$).



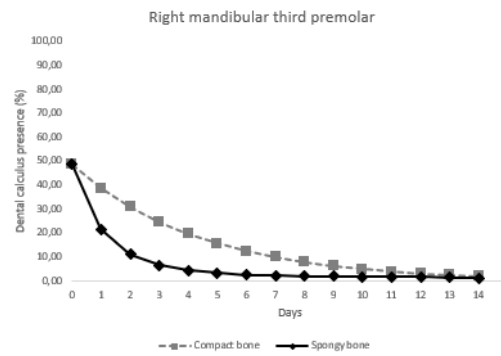
Regression equations generated are: Compact bone (grey broken line): $y = \exp(4.434 - 0.413624x + 0.0402943x^2 - 0.0011383x^3)$; Spongy bone (black solid line): $y = \exp(4.434 - 0.63568x + 0.0402943x^2 - 0.0011383x^3)$ ($r^2 = 0.764912$).



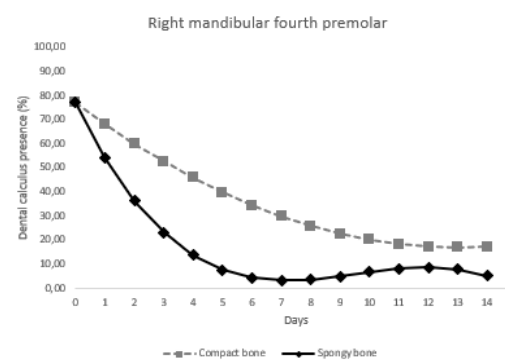
Regression equations generated are: Compact bone (grey broken line): $y = \exp(4.02549 - 0.302881x + 0.000645601x^2)$; Spongy bone (black solid line): $y = \exp(4.02549 - 0.488505x + 0.111292x^2 - 0.003653819x^3)$ ($r^2 = 0.522375$).



Regression equations generated are: Compact bone (grey broken line): $y = \exp(4.48547 - 0.212024x + 0.00764672x^2)$; Spongy bone (black solid line): $y = \exp(4.48547 - 0.762876x + 0.06716202x^2 - 0.00213367x^3)$ ($r^2 = 0.708395$).



Regression equations generated are: Compact bone (grey broken line): $y = \exp(3.88265 - 0.226613x)$; Spongy bone (black solid line): $y = \exp(3.88265 - 0.896557x + 0.085214x^2 - 0.00281807x^3)$ ($r^2 = 0.705604$).



Regression equations generated are: Compact bone (grey broken line): $y = 77.0371 - 9.2151x + 0.353946x^2$; Spongy bone (black solid line): $y = 77.0371 - 25.6316x + 2.85081x^2 - 0.0990608x^3$ ($r^2 = 0.588312$).

Figure 4. Effect of different types of autoclaved beef bones on dental calculus removal along the treatment period in adult Beagle dogs.

The dental calculus reduction was similar regardless of the bone density provided to dogs on teeth 104, 304, 404 and 406 ($P > 0.10$) (Fig 5), time was the predominant factor in the removal of dental calculus.

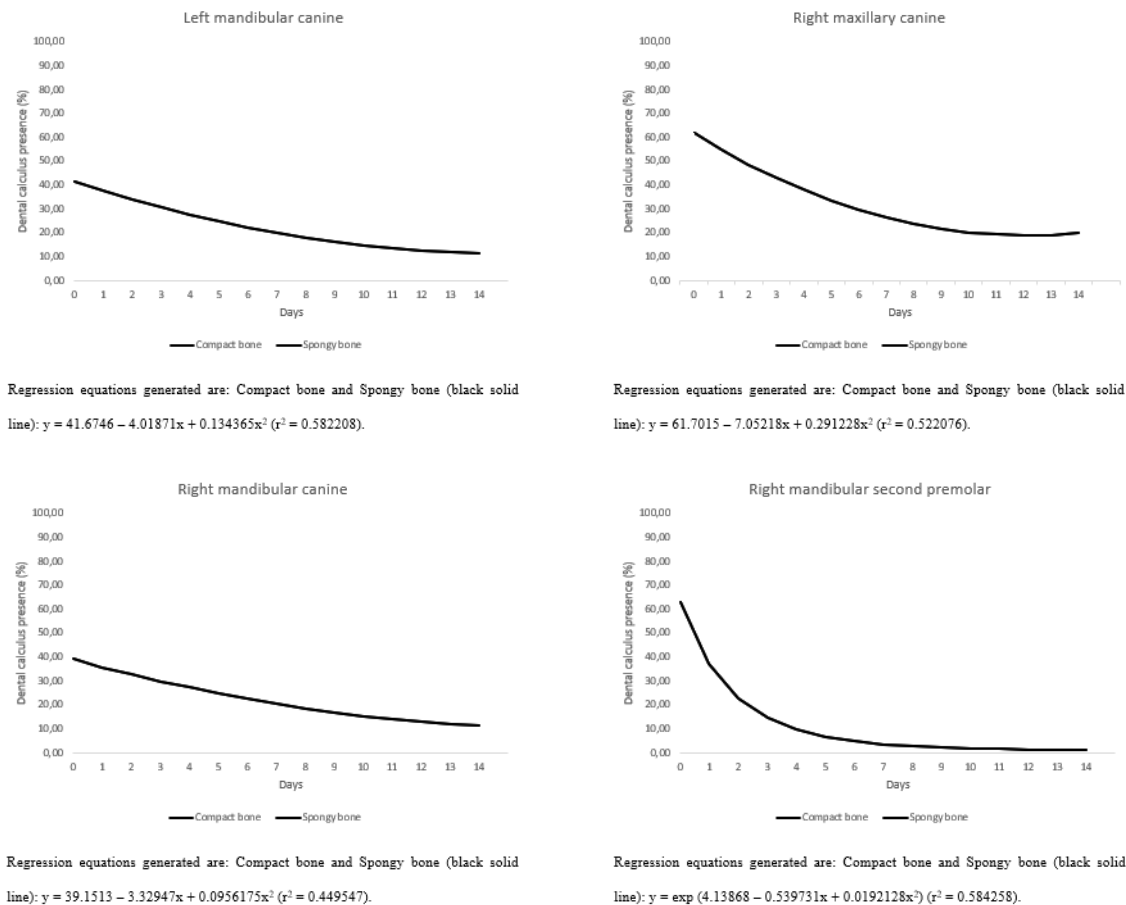


Figure 5. Effect of time on dental calculus removal along the treatment period in adult Beagle dogs receiving different types of autoclaved beef bones.

Macroscopic evaluations indicated occurrence of some lesions related only to the SB treatment ($n = 7$) (Table 2). There was a prevalence of gingival traumatic lesions. Other lesions observed, included: presence of pieces of bones between teeth in two dogs, and one dental extraction due to extensive alveolar bone loss and dental mobility degree II that was present on day 0, but on day 14 had to be extracted (Fig 6). Premolars are used by dogs chewing bones, so instead a lesion be preexistent bones probably contributed for final extraction.

Table 2. Number and localization of dental injuries in adult Beagle dogs after bone supplementation with different densities for 13 days.

Lesions		Treatments	
		Compact bone	Spongy bone
Gingiva	Traumatic lesions	-	306, 307, 407, 408 (n=4)
Others	Presence of bone between teeth	-	308-309, 408-409 (n=2)
	Tooth extraction	-	205 (n=1)
Total		-	7

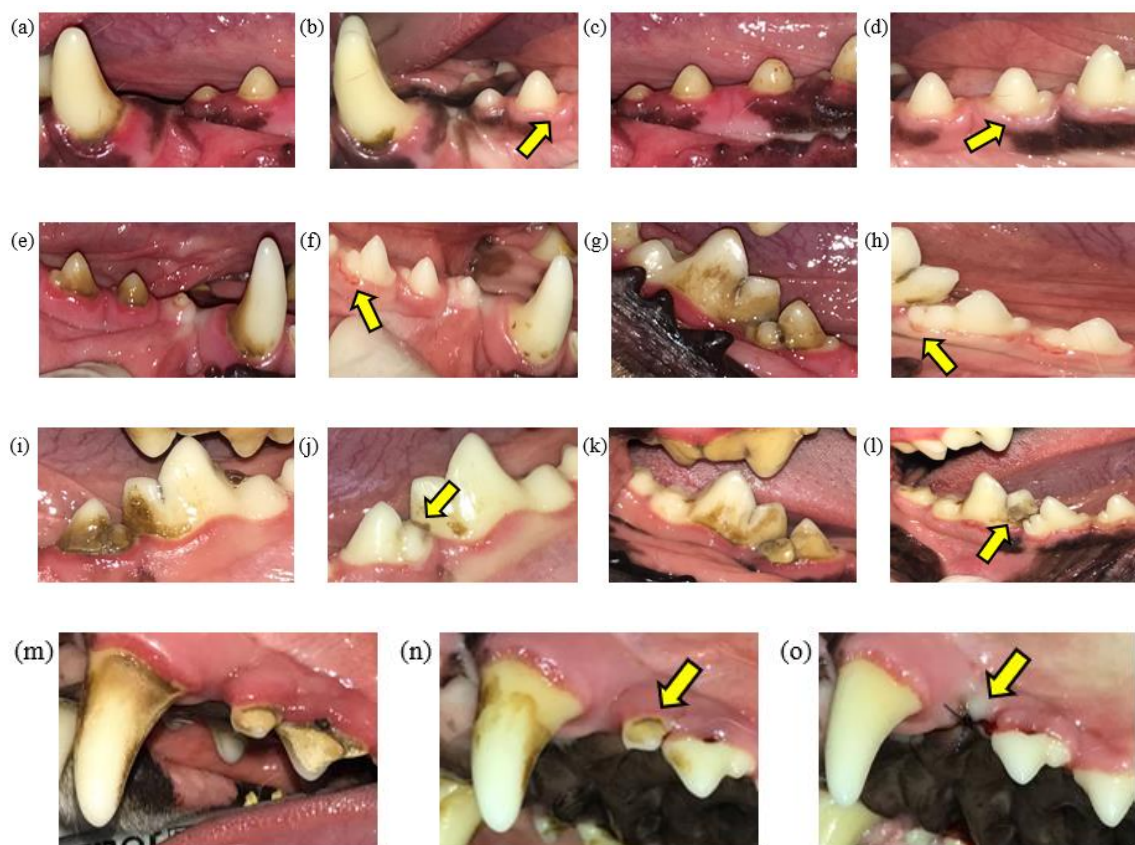


Figure 6. (a) Day 0, (b) Day 14 gingival traumatic injury on 306; (c) Day 0, (d) Day 14 gingival traumatic injury on 307; (e) Day 0, (f) Day 14 gingival traumatic injury on 407; (g) Day 0, (h) Day 14 gingival traumatic injury on 408; (i) Day 0, (j) Day 14 presence of

bone between teeth 308 and 309; (k) Day 0, (l) Day 14 presence of bone between teeth 408 and 409; (m) Day 0, (n) Day 14 and (o) Day 14 after prophylaxis tooth extraction on 205.

The teeth most affected by the act of chewing bones were the premolars and molars. No endodontic lesions were observed, such as dental dimming, periapical abscess, enlargement of the pulp chamber or root canal. As expected, no dog presented enamel or root fractures due to the continuous supplementation of bones. Moreover, complications such as esophageal and intestinal obstructions were not observed during the period in which the dogs received the bones.

Discussion

The objective of the study was to evaluate the effect of supplementation with autoclaved bones of different densities on the dental calculus removal, and how this would impact the oral and dental health of adult dogs, based on the ability of the bones to promote removal of large deposits of dental calculus by friction on dental surface. Bovine raw compact and spongy bones are effective in removing large deposits of dental calculus over short periods of time, improving oral health and wellbeing in adult Beagle dogs, as already reported by Marx et al. [18], but remains unevaluated the injuries that may occur on the gingiva, enamel and roots of teeth.

In this study, we expected that supplementation with autoclaved compact (CB) and spongy (SB) bones could promote intense dental calculus removal, similarly to that observed with raw compact and spongy bones, minimizing the risk of Salmonella contamination by sterilization. We hypothesized that supplying autoclaved bones would

be beneficial in reducing dental calculus without the incidence of lesions on enamel, roots and gingiva of adult Beagle dogs. Radiographs were performed on all dogs on the day prior to the beginning of bone supplementation, and again 14 days after starting experimental period so the lesions reported came exclusively from 14 days.

Both types of bones used in this study were highly effective in removing dental calculus. Differences between treatments were visible after 3 days of supplementation with significant dental calculus reduction of 69.6% on SB group and 47.2% on CB related to the day 0. However, the differences regarding to the type of bones occurred only from day 9 (87.5% SB vs. 75.3% CB), with extensive reduction after 13 days of supplementation (92.8% SB vs. 80.8% CB). As reported by Marx et al. [18], the difference in the dental surface cleaning potential observed between the bones can be attributed to the distinct histological characteristic presented by the epiphysis and diaphysis of the femoral bone. The SB allows the teeth to penetrate in the matrix thus increasing the surface contact between tooth and bone, promoting enough friction to remove thick deposits of calculus in a few days. The CB, due to their greater hardness, requires more time and mechanical work to promote similar cleaning compared to SB.

The masticatory behavior of dogs interfered in the dental calculus removal. Dogs preferred use premolar and molar teeth to chew than canine teeth. This is due to the different functions assigned to the teeth according to their morphology. Thus, premolar and molar teeth are responsible for mastication and grinding because they have a broad and flat surface, while the canines serve to seize and tear the food due to its conical shape [28].

Physical properties of food, especially texture, positively influence the oral health of domestic dogs. Dry foods promote abrasion to the dental surface due to the need of mechanical forces, such as more intense apprehension and chewing, when compared to

soft foods, unable to promote abrasion, thus facilitating dental plaque and calculus maintenance [9]. Gawor et al. [3] observed higher incidence of lymphadenopathy (81.8% vs. 54.8%), dental calculus (44.3% vs. 17.2%) and periodontitis (77.8% vs. 45.3%) in dogs fed moist diets compared to those fed a dry diet. Buckley et al. [4] observed a deterioration in the oral health index of dogs fed moist and home diets, increasing the probability of developing oral diseases. However, the dogs used in this study consumed dry food since puppies and the percentage of dental calculus was high at day 0 of the experimental period, evidencing the low effectiveness of kibbles in promoting friction. Although dry foods do not promote the complete removal of dental plaques and calculus, or act effectively in the prevention of periodontitis, their physical characteristics are beneficial in promoting abrasiveness during mastication compared to soft foods, directly affecting an improvement of oral health.

The use of supplements with specific actions in promotion of oral health, added to diet or treats show substantial results on dental plaque and calculus reduction. The polyphosphates act preventing dental plaques and calculus formation through their activity as chelators of calcium salts present in saliva, avoiding the mineralization of plaque, thus reducing the incidence of dental calculus [29]. A study evaluating daily supplementation of biscuits coated with 0.6% sodium hexametaphosphate for 4 weeks reduced dental calculus formation by 80% [10]. In another study using the same dosage, dental calculus formation was reduced by only 46% over 4 weeks [11]. Carciofi et al. [12] evaluated the daily supplementation of biscuits coated with 0.6% sodium pyrophosphate for 4 weeks and observed a reduction of 18.9% in dental calculus index. Pinto et al. [14], compared supplements added in the mash or coated on the kibble. They observed a reduction of 24.2% in dental calculus when coating the kibbles with sodium

tripolyphosphate and sodium hexametaphosphate promoted a dental calculus reduction of 34.2% when added in the mash and 47.6% when coated.

The use of masticatory items helps in the removal of dental plaque and calculus. Quest [30] observed reduction of plaque, calculus and halitosis in dogs that received one dental chew daily for 28 days. The use of a soft rawhide chew item for Beagle dogs was evaluated by Stookey [17] for 4 weeks, with reductions of 28.2% of calculus, 18.5% of plaques and 45.7% of gingivitis compared to the control group.

As mentioned above, there are innumerable alternatives for oral health maintenance and prevention, however no method is completely efficient in total removal of plaques and dental calculus. The periodontal treatment, executed by a specialized professional, makes possible the complete cleaning of the teeth and must be executed periodically. A regular home oral care program should be established as a preventive measure, thus prolonging the interval between procedures. Daily tooth brushing is the most effective home-based method for removal and control of dental plaques. A study with Beagle dogs evaluating the effect of frequency of brushing teeth demonstrated that brushing daily or every other day was beneficial in controlling plaque and calculus accumulation, reducing the severity of pre-existing gingivitis [31]. However, the procedure should be performed with a specific type of toothbrush and technique to avoid damage to gingival tissue [32]. In addition, daily brushing demands time and commitment from tutors, which in the troubled routine of the majority of tutors reduces adherence to the procedure.

Among the several alternatives mentioned above to control dental plaques and calculus, the superior results obtained in the present study show the high potential of bone supplementation in oral health maintenance of adult dogs. Although there is a restriction from vets and tutors to the adoption of bones in the diet. Several reports use to associate

the consumption of bones with choking, visceral perforation and formation of esophageal and intestinal concretions [33,34,35]. But also, it is important to point out that the consumption of carcasses containing bones is a common habit in wild dogs and wolves, and the occurrence of dental calculus and oral diseases is extremely low in those species [20]. Additionally, bone supplementation improves animal welfare due to the time spent during chewing [36]. Accidents with bones in dogs are related with type and size of bones consumed. This trial was made with specific bones, cut into pieces that we considered safe for Beagle to avoid swallowing, offered in the morning and recovered after 20 hours. Also, each day a new piece of bone was offered again. That procedure allowed a high level of control that must be difficult to replicate with domestic dogs of different breeds under different care.

Dental injuries in dogs are usually resulting from fights with other animals, falls, vehicular accidents and chewing of hard objects such as stones and bones [37]. The lateralized chewing behavior presented by dogs increased the incidence of lesions on the premolar and molar teeth, especially of the upper arch. No fractures on the roots and enamel of teeth were observed on the evaluation of arches photograph or radiographs. The main lesions from bone supplementation affected the gingival tissue. The constant abrasion applied by the bones to the gingival tissue facilitated the occurrence of injuries such as traumatic lesions (n = 4).

Excessive friction promotes migration of the gingival margin in the apical direction, forming, primarily, gingival fissures or clefts that can heal without permanent damage. However, the maintenance of mechanical forces submitted to the marginal gingival tissue implies in the formation of recessions or more severe gingival retractions. In humans, malconducted toothbrushing with force and the use of non-soft bristle toothbrushes increases the incidence of gingival fissures [38]. The high incidence of

gingival injuries was due to the continuous friction between bone and the tissue. However, these results could be obtained by the masticatory act of other chewing items or even toys. Despite the gingival traumas caused by the impact of bone chewing, continuous bone supplementation for 13 days reduced pre-existing redness and gingival edema on day 0. Thus, mechanical removal of the dental calculus improved the health of gingival tissue. The consistency and porosity of SB allowed greater mechanical action thus facilitating the breakage, which justify the presence of bone between teeth in two dogs of the treatment.

Supplementation with bones of different textures presented contrasting results regarding the removal of dental calculus, with greater SB efficiency. Despite the prevalence of gingival lesions, no fracture or bone resorption was observed at the teeth roots. The use of bones, specially SB, as a regular home oral care program should be considered, given its high effectiveness in removing thick deposits of dental calculus within a few days after the start of supplementation. Compact bones were not associated with lesions of dental fracture as we expected. It cleans efficiently but need more time of supplementation to reach the same reduction promoted by SB. Bone chewing does not promote removal of plaque or dental calculus from the subgingival surface, but its efficiency in removing the supragingival plaque and calculus allows the intervals between periodontal cleaning to be prolonged. Long-term studies should be performed to evaluate its impact on dental structures over a higher period than 13 days.

Conclusions

Bone supplementation was highly efficient in removing dental calculus in adult Beagle dogs, especially SB, emphasizing the abrasive capacity of femoral bones. As we

expected, root fracture, enamel fracture and bone resorptions were not produced due to the continuous consumption of bones for 13 days. Despite the incidence of gingival lesions, the use of bones as chewing items allows the maintenance of oral health in a superior way to other masticatory items available in pet market today. In order to test the long-term safety of bone as chewing items, further studies should examine supplementation over periods longer than the used in this study, 13 days, so that the impact of continuous and long-term mastication on teeth and periodontium can be known. Additionally, complementary studies should be conducted aiming the development of chewing items with porosity close to SB in order to increase the variety of efficient masticatory items to improve the cleanliness and maintenance of canine oral health. Bones promote cleaning of more than 90% of dental calculus over the teeth and must be associated regular oral prophylaxis. Pieces of SB must be stocked between teeth and need to be removed otherwise injuries may occur.

Acknowledgement

The authors are thankful for the financial support given by Brazilian governmental research support institution Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES.

References

1. Gorrel C. Periodontal disease and diet in domestic pets. *J Nutr*, 1998;128:2712S-4.

2. Logan EI, Finney O, Hefferren JJ. Effects of a dental food on plaque accumulation and gingival health in dogs. *J Vet Dent*, 2002;19:15-8.
3. Gawor JP, Reiter AM, Jodkowska K, Kurski G, Wojtacki MP, Kurek A. Influence of diet on oral health in cats and dogs. *J Nutr*, 2006;136:2021S–3.
4. Buckley C, Colyer A, Skrzywanek M, Jodkowska K, Kurski G, Gawor J, et al. The impact of home-prepared diets and home oral hygiene on oral health in cats and dogs. *Br J Nutr*, 2011;106(1):S124-7.
5. DeBowes LJ, Mosier D, Logan E, Harvey CE, Lowry S, Richardson DC. Association of periodontal disease and histologic lesions in multiple organs from 45 dogs. *J Vet Dent*, 1996;13(2):57-60.
6. Pavlica Z, Petelin M, Juntos P, Erzen D, Crossley DA, Skaleric U. Periodontal disease burden and pathological changes in organs of dogs. *J Vet Dent*, 2008;25(2):97-105.
7. Kortegaard HE, Eriksen T, Baelum V. Periodontal disease in research Beagle dogs – An epidemiological study. *J Small Anim Pract*, 2008;49:610–6.
8. Zambori C, Tirziu E, Nichita I, Cumpanasoiu C, Gros RV, Seres M, et al. Biofilm implication in oral diseases of dogs and cats. *J Anim Sci Biotechnol*, 2012;45(2):208-12.
9. Watson ADJ. Diet and periodontal disease in dogs and cats. *Aust Vet J*, 1994;71:313-8.
10. Stookey GK, Warrick JM, Miller LL. Effect of sodium hexametaphosphate on dental calculus formation in dogs. *Am J Vet Res*, 1995;56:913-8.
11. Stookey GK, Warrick JM, Miller LL, Katz BP. Hexametaphosphate-coated snack biscuits significantly reduce calculus formation in dogs. *J Vet Dent*, 1996;13:27–30.

12. Carciofi AC, Bazolli RS, Barbudo GR, Zanni A, Carvalho AZ. Evaluation of the effect of extruded biscuit coated with sodium pyrophosphate on the pre-existing plaque and dental calculus in dogs. *Ars Vet*, 2007;23(1):47–53.
13. Paiva AC, Saad FMOB, Leite CAL, Duarte A, Pereira DAR, Jardim CAC. Eficácia dos coadjuvantes de higiene bucal utilizados na alimentação de cães. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 2007;59(5):1177-83.
14. Pinto ABF, Saad FMOB, Leite CAL, Aquino AA, Alves MP, Pereira DAR. Sodium tripolyphosphate and sodium hexametaphosphate in preventing dental calculus accumulation in dogs. *Arq Bras Med Vet Zoo*, 2008;60(6):1426-31.
15. Lage A, Lausen N, Tracy R, Allred E. Effect of chewing rawhide and cereal biscuit on removal of dental calculus in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 1990;197(2):213-9.
16. Fujita K, Itoh H, Sasahara S, Tokita M, Osada Y, Kawashige Y. The role of a dental chew in maintaining periodontal health in dogs. *J Anim Clin Med*, 2008;17(4):109-15.
17. Stookey GK. Soft rawhide reduces calculus formation in dogs. *J Vet Dent*, 2009;26:82-5.
18. Marx FR, Machado GS, Pezzali JG, Marcolla CS, Kessler AM, Ahlstrøm Ø, et al. Raw beef bones as chewing items to reduce dental calculus in Beagle dogs. *Aust Vet J*, 2016;94(1-2):18-23.
19. Vosburgh KM, Barbiers RB, Sikarskie JG, Ullrey DE. A soft versus hard diet and oral health in captive timber wolves (*Canis lupus*). *J Zoo Anim Med*, 1982;13:104-7.
20. Shelbourne T. Life and behaviour of wolves. Wolf teeth: dentition and disease. *Wolf Print*, 2010;39:12-3.

21. Kapoor V, Antonelli T, Parkinson JA, Hartstone-Rose A. Oral health correlates of captivity. *Res Vet Sci*, 2016;107:213-9.
22. Laflamme D. Development and validation of a body condition score system for dogs.: a clinical tool. *Canine Pract*, 1997;22:10-5.
23. National Research Council - NRC. Nutrient requirements of dogs and cats. National Academies Press. Washington, USA, 2006.
24. Association of American Feed Control Officials - AAFCO. Official publication. Champaign, USA. 2007.
25. Floyd M R. The modified Triadan system: Nomenclature for veterinary dentistry. *J. Vet. Dent*, 1991;8:18–19.
26. Crossley D. Veterinary Dentistry Basics. Royal Veterinary College. London, UK, 2002.
27. Abdalla SL, Silva MFA, Pereira ARC, Azevedo FD, Fernandes JI, Minono GP, et al. Computer quantification for the evaluation of dental plaque and dental calculus index in the digital image of vestibular surface of the teeth of dogs. *Pesq Vet Bras*. 2009;29:666-72.
28. Wiggs RB, Lobprise HB. Veterinary dentistry: Principles & practice. Nova York: Lippincott-Raven, USA, 1997.
29. Hennet P, Servet E, Venet C. Effectiveness of an oral hygiene chew to reduce dental deposits in small breed dogs. *J Vet Dent*, 2006; 23(1):6-12.
30. Quest BW. Oral health benefits of a daily dental chew in dogs. *J Vet Dent*, 2013;30(2):84-7.
31. Harvey CE, Serfilippi L, Barnvos D. Effect of Frequency of Brushing Teeth on Plaque and Calculus Accumulation, and Gingivitis in Dogs. *J Vet Dent*, 2015;32(1):16–21.

32. Anneroth G, Poppelman A. Histological evaluation of gingival damage by toothbrushing. An experimental study in dog. *Acta Odontol Scand*, 1975;33(3):119-27.
33. Juvet F, Pinilla M, Schiel RE, Mooney CT. Oesophageal foreign bodies in dogs: factors affecting success of endoscopic retrieval. *Ir Vet J*, 2010;63(3):163-168.
34. Gianella P, Pfammater NS, Burgener IA. Oesophageal and gastric endoscopic foreign body removal: complications and follow-up of 102 dogs. *J Small Anim Pract*, 2009;50(12):649-654.
35. Thompson HC, Cortes Y, Gannon K, Bailey D, Freer S. Esophageal foreign bodies in dogs: 34 cases (2004-2009). *J Vet Emerg Crit Care*, 2012;22(2):253-261.
36. Döring D, Ketter DA, Klima A, Küchenhoff H, Dobenecker B, Schmidt J, et al. Horn of calf hooves as chews in laboratory dogs. *J Vet Behav*, 2016;13:39-45.
37. Gracis M, Orsini P. Treatment of traumatic dental displacement in dogs: six cases of lateral luxation. *J Vet Dent*, 1998;15(2):65-72.
38. Greggianin BF, Haas AN, Oppermann RV. The incidence of gingival fissures associated with toothbrushing: crossover 28-day randomized trial. *J Clin Periodontol*, 2013;40:319-26.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de itens mastigatórios tem se destacado nos últimos anos devido seu potencial em restaurar e preservar a saúde oral de animais de companhia. As doenças orais, em especial a periodontite, impactam negativamente a saúde oral e sistêmica do animal acometido. A expectativa de vida aumentada dos animais de companhia na atualidade demanda cuidados especiais, uma vez que a incidência das afecções orais é superior com o avançar da idade. Embora os cães não utilizem a mastigação efetiva da ração eles necessitam dos dentes para a apreensão do alimento. Diante disso, a indústria de alimentos para animais de companhia tem feito uso de ingredientes com ação específica à prevenção de placas e cálculos, como polifosfatos, até a produção de alimentos coadjuvantes, como biscoitos e petiscos, que promovam a remoção mecânica de placas e cálculos pré-existentes.

As propriedades físicas do alimento, principalmente a textura, influenciam a saúde oral. Assim, alimentos úmidos e macios impactam negativamente a saúde oral por promoverem menos atrito à superfície dentária. A suplementação com ossos remonta a décadas passadas em que os animais recebiam sobras de alimentos. Ainda hoje diversos tutores fazem uso de ossos afim de fornecer um alimento com textura capaz de promover a remoção mecânica de cálculos dentários. Na vida selvagem os animais carnívoros e onívoros, inclusive os lobos cinzentos, ancestrais direto do cão doméstico, consomem naturalmente carcaças contendo ossos, fator crucial na reduzida incidência de afecções orais nestas espécies.

A utilização de ossos como itens mastigatórios advém de conveniências como: facilidade de aquisição e manipulação, baixo custo agregado, elevada disponibilidade. Alguns tutores e profissionais possuem algumas limitações ao uso de ossos dada a sua dureza excessiva. Assim, esta pesquisa teve como objetivo avaliar os impactos da suplementação com ossos autoclavados de densidades distintas sobre raízes, esmalte e gengiva de cães Beagle adultos ao longo do tempo.

O consumo de ossos esponjosos autoclavados apresentou maior eficiência na redução de cálculos dentários no período avaliado. Foram observadas apenas lesões traumáticas ao tecido gengival provenientes do consumo de ossos esponjosos. A característica mole da gengiva facilitou o desenvolvimento de lesões, principalmente pela mastigação intensa e contínua dos ossos promovendo impactos constantes ao tecido gengival. No entanto, lesões gengivais podem ser causadas por atritos oriundo da mastigação de itens mastigatórios como brinquedos. Houve predomínio de lesões nos dentes pré-molares e molares, indicando uso preferencial destes dentes durante a mastigação. Como esperado, não foram observadas fraturas de raiz, esmalte e reabsorções ósseas, bem como obstruções esofágicas e intestinais em resultado à suplementação com ossos como reportado por diversos estudos, e principal restrição ao seu uso.

Estudos avaliando os impactos da suplementação com itens mastigatórios sobre as estruturas orais não foram encontrados, a totalidade se detém apenas a avaliação da redução de placas e cálculos dentários. Como reportado, a estrutura esponjosa foi mais rapidamente eficiente na remoção de cálculos pré-existentes e resultou em lesões de baixa severidade. Desta forma, o uso de ossos autoclavados, em especial ossos esponjosos, oferece benefícios à manutenção da saúde oral de cães adultos, permitindo o prolongamento do

intervalo entre as profilaxias. Estudos a longo prazo devem ser realizados com o objetivo de avaliar o impacto da suplementação em períodos superiores ao utilizado no presente estudo. Adicionalmente, pesquisas futuras devem buscar a produção de itens mastigatórios com textura e porosidade similar à apresentada pelos ossos esponjosos, permitindo assim ampliar a disponibilidade de produtos eficazes na remoção mecânica de cálculos dentários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. The pathogenesis of periodontal diseases (position paper). **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 70, n. 4, p. 457-470, 1999.

ANDREASEN, J. O. **Traumatic injuries to the teeth**. 2nd ed. Copenhagen: Munksgaard, 1981.

BAILIE, W. E.; STOWE, E. C.; SCHMITT, A. M. Aerobic bacterial flora of oral and nasal fluids of canines with reference to bacteria associated with bites. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 7, n. 2, p. 223-231, 1978.

BUTKOVIĆ, V. *et al.* Dental diseases of dogs: a retrospective study of radiological data. **Acta Veterinaria Brno**, Czech, v. 70, p. 203-208, 2001.

CARCIOFI, A. C. *et al.* Evaluation of the effect of extruded biscuit coated with sodium pyrophosphate on the pre-existing plaque and dental calculus in dogs. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 47-53, 2007.

COIGNOUL, F.; CHEVILLE, N. Calcified microbial plaque. Dental calculus of dogs. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 117, n. 3, p. 499-501, 1984.

DAHLÉN, G. *et al.* Predominant bacterial species in subgingival plaque in dogs. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 47, n. 3, p. 354-364, 2012.

DAVIS, I. J. *et al.* A cross-sectional survey of bacterial species in plaque from client owned dogs with healthy gingiva, gingivitis or mild periodontitis. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 12, [art.] e83158, 2013.

DEBOWES, L. J. *et al.* Association of periodontal disease and histologic lesions in multiple organs from 45 dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, Boise, v. 13, n. 2, p. 57-60, 1996.

ELLIOTT, D. R. *et al.* Cultivable oral microbiota of domestic dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 11, p. 5470–5476, 2005.

FLANCMAN, R.; SINGH, A.; WEESE, J. S. Evaluation of the impact of dental prophylaxis on the oral microbiota of dogs. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 13, n. 6, [art.] e0199676, 2018.

FUJITA, K. *et al.* The role of a dental chew in maintaining periodontal health in dogs. **Journal of Animal Clinical Medicine**, Tottori, v. 17, n. 4, p. 109-115, 2008.

GAD, T. Periodontal disease in dogs. I. Clinical investigation. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 3, n. 4, p. 268-272, 1968.

GIANELLA, P.; PFAMMATER, N. S.; BURGNER, I. A. Oesophageal and gastric endoscopic foreign body removal: complications and follow-up of 102 dogs. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 50, n. 12, p. 649-654, 2009.

GIOSO, M. A. **Odontologia veterinária para o clínico de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2007. 142 p.

GORREL, C. **Odontologia em pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 240 p.

GORREL, C. Periodontal disease and diet in domestic pets. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 128, p. 2712S–2714S, 1998. Supl. 12.

GRACIS, M.; ORSINI, P. Treatment of traumatic dental displacement in dogs: six cases of lateral luxation. **Journal of Veterinary Dentistry**, Boise, v. 15, n. 2, p. 65-72, 1998.

HAMP, S. E. *et al.* A macroscopic and radiologic investigation of dental diseases of the dog. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, Raleigh, v. 25, n. 2, p. 86–92, 1984.

HARDHAM, J.; DREIER, K.; WONG, J. Pigmented-anaerobic bacteria associated with canine periodontitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 1-2, p. 119–128, 2005.

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

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

HARVEY, C. E.; SERFILIPPI, L.; BARNVOS, D. Effect of frequency of brushing teeth on plaque and calculus accumulation, and gingivitis in dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, Boise, v. 32, n. 1, p. 16–21, 2015.

HARVEY, C. E.; SHOFER, F. S.; LASTER, L. Association of age and body weight with periodontal disease in North American dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, Boise, v. 11, n. 3, p. 94-105, 1994.

HENNET, P. R. P.; HARVEY, C. E. C. Aerobes in periodontal disease in the dog: a review. **Journal of Veterinary Dentistry**, Boise, v. 8, n. 1, p. 9-11, 1991.

HENNET, P.; SERVET, E.; VENET, C. Effectiveness of an oral hygiene chew to reduce dental deposits in small breed dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, Boise, v. 23, n. 1, p. 6-12, 2006.

HOLCOMB, L. J. *et al.* Early canine plaque biofilms: characterization of key bacterial interactions involved in initial colonization of enamel. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 12, [art.] e113744, 2014.

ISHIKAWA, I. Host responses in periodontal diseases: a preview. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 43, n. 1, p. 9-13, 2007.

JUVET, F. *et al.* Oesophageal foreign bodies in dogs: factors affecting success of endoscopic retrieval. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v. 63, n. 3, p. 163-168, 2010.

KINANE, D. F.; BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Host–parasite interactions in periodontal disease. *In*: LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Clinical periodontology and implant dentistry**. 4th ed. Oxford, UK: Blackwell Munksgaard, 2003. p. 186–231.

KLINDWORTH, A. *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 1-11, 2013.

KOLENBRANDER, P.; ANDERSEN, R.; MOORE, L. Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. **Infection and Immunity**, Washington, v. 57, n. 10, p. 3194–3203, 1989.

KORTEGAARD, H. E.; ERIKSEN, T.; BÆLUM, V. Periodontal disease in research Beagle dogs: an epidemiological study. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 49, n. 12, p. 610–616, 2008.

KYLLAR, M.; WITTER, K. Prevalence of dental disorders in pet dogs. **Veterinární Medicína**, Czech, v. 50, n. 11, p. 496–505, 2005.

LINDHE, J.; HAMP, S. E.; LÖE, H. Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 10, n. 5, p. 243-255, 1975.

LOGAN, E. I.; FINNEY, O.; HEFFERREN, J. J. Effects of a dental food on plaque accumulation and gingival health in dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, Boise, v. 19, n. 1, p. 15-18, 2002.

LOGAN, E. I. *et al.* Periodontal disease. *In*: HAND, M. S.; THATCHER, C. D.; REMILLARD, R. L. (ed.). **Small animal clinical nutrition**. 5 th ed. Topeka, Kan: Mark Morris Institute, 2010. p. 979-1001.

MARX, F. R. *et al.* Raw beef bones as chewing items to reduce dental calculus in Beagle dogs. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 94, n. 1-2, p. 18-23, 2016.

NIEMIEC, B. A. Periodontal disease. **Topics in Companion Animal Medicine**, New York, v. 23, n. 2, p. 72-80, 2008a.

NIEMIEC, B. A. Periodontal therapy. **Topics in Companion Animal Medicine**, New York, v. 23, n. 2, p. 81–90, 2008b.

PAIVA, A. C. *et al.* Eficácia dos coadjuvantes de higiene bucal utilizados na alimentação de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 5, p. 1177-1183, 2007.

PATEL, S.; KANAGASINGAM, S.; FORD, T. P. External cervical resorption: a review. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 35, n. 5, p. 616-625, 2009.

PAVLICA, Z. *et al.* Periodontal disease burden and pathological changes in organs of dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, Boise, v. 25, n. 2, p. 97-105, 2008.

PINTO, A. B. F. *et al.* Sodium tripolyphosphate and sodium hexametaphosphate in preventing dental calculus accumulation in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 6, p. 1426-31, 2008.

QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 41, p. D590-D596, 2013.

QUEST, B. W. Oral health benefits of a daily dental chew in dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, Boise, v. 30, n. 2, p. 84-87, 2013.

ROBINSON, J. G. A. **Everyday dentistry for the cat and dog**. Peterborough: Henston, 2002. 60 p.

ROMÁN, F. S. **Atlas de odontologia de pequenos animais**. São Paulo: [Ed. Manole], 1999. 111 p.

ROZA, M. R. **Princípios de odontologia veterinária**. Brasília: [Ed. Do Autor], 2012. 182 p.

SORENSEN, W. P.; LÖE, H.; RAMFJORD, S. P. Periodontal disease in the beagle dog. A cross sectional clinical study. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 15, n. 4, p. 380-389, 1980.

SPODNICK, G. J. Replantation of a maxillary canine tooth after traumatic avulsion in a dog. **Journal of Veterinary Dentistry**, Boise, v. 9, n. 4, p. 4-7, 1992.

STOOKEY, G. K. *et al.* Hexametaphosphate-coated snack biscuits significantly reduce calculus formation in dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, Boise, v. 13, n. 1, p. 27-30, 1996.

STURGEON, A. *et al.* Metagenomic analysis of the canine oral cavity as revealed by high-throughput pyrosequencing of the 16S rRNA gene. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 162, n. 2-4, p. 891-898, 2013.

TENG, Y. T. Protective and destructive immunity in the periodontium: Part 1: innate and humoral immunity and the periodontium. **Journal of Dental Research**, Thousand Oaks, v. 85, n. 3, p. 198-208, 2006.

THOMPSON, H. C. *et al.* Esophageal foreign bodies in dogs: 34 cases (2004-2009). **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, San Antonio, v. 22, n. 2, p. 253-261, 2012.

VAN DYKE, T. E.; DAVE, S. Risk factors for periodontitis. **Journal of the International Academy of Periodontology**, London, v. 7, n. 1, p. 3-7, 2005.

WADE, W. Unculturable bacteria: the uncharacterized organisms that cause oral infections. **Journal of the Royal Society of Medicine**, London, v. 95, n. 2, p. 81-83, 2002.

WALLIS, C. *et al.* A longitudinal assessment of changes in bacterial community composition associated with the development of periodontal disease in dogs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 181, n. 3-4, p. 271-282, 2015.

WATSON, A. D. Diet and periodontal disease in dogs and cats. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 71, n. 10, p. 313-318, 1994.

WEST-HYDE, L.; FLOYD, M. Dentistry. *In*: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (ed.). **Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat**. 4th ed. Philadelphia, Pa.: Saunders, 1995. p. 1102–1107.

WHITE, D. J.; GERLACH, R. W. Anticalculus effects of a novel, dual-phase polypyrophosphate dentifrice: chemical basis, mechanism, and clinical response. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, Cincinnati, v. 1, n. 4, p. 1-19, 2000.

WIGGS, R. B.; LOBPRISE, H. B. Periodontology. *In*: WIGGS, R. B.; LOBPRISE, H. B. (ed.). **Veterinary dentistry: principles and practice**. Philadelphia; New York: Lippincott - Raven, 1997. cap. 8, p. 186–231.

WILLIAMS, R. C. Periodontal disease. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 322, n. 6, p. 373-382, 1990.

APÊNDICES

Apêndice A – Carta de aprovação do Comitê de ética no uso de animais



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 25685

Título: Efeito coadjuvante do fornecimento de ossos crus e raspa de couro bovino na remoção do cálculo dentário de cães adultos

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

LUCIANO TREVIZAN - coordenador desde 01/10/2013
ALEXANDRE DE MELLO KESSLER - pesquisador desde 01/10/2013
Liege Teixeira - pesquisador desde 01/10/2013
MANUELA MARQUES FISCHER - pesquisador desde 01/10/2013
FELIPE FRIEDRICH SORGETZ - pesquisador desde 01/10/2013
JULIA GUAZZELLI PEZZALI - pesquisador desde 01/10/2013
Fábio Ritter Marx - pesquisador desde 01/10/2013
Geruza Silveira Machado - pesquisador desde 01/10/2013

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 06/01/2014 - Sala I do Gabinete do Reitor - Prédio da Reitoria - Campus do Centro - POA, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 10 cães da raça Beagle, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 31 de Janeiro de 2014

STELA MARIS KUZE RATES
Coordenador da comissão de ética

Apêndice B – Normas para redigir o capítulo II – Publicação no periódico PLOS One



TITLE, AUTHOR, AFFILIATIONS FORMATTING GUIDELINES

1

2

3

4

This is the article title

5

6

7

John Doe¹, Asteris Data², Johannes van Sta³, Merie Testerson⁴, David

8

Ribosome Jr.⁵, Gregory H.T. McBio⁶, Angela Reviewson^{7,8}, Merina

9

Measure⁹, on behalf of The Bunny Genome Sequencing Consortium^{*}

10

11

12

13

¹ Department, Institution, City, State, Country

14

² Department of Dermatology, Division of Rabbit Health, Section of Veterinary Medicine, St. Hare Hospital, San Francisco, California, United States of America

15

16

³ Department of Libraries and Archives, National Contemporary Bunny Museum, Lagomorph, Connecticut, United States of America

17

18

⁴ Department of Restoration, National Contemporary Bunny Museum, Lagomorph, Connecticut, United States of America

19

20

⁵ Department of Archaeology, Bunny University, Lagomorph, Connecticut, United States of America

21

22

⁶Current Address: Department of Carrot Science, Bunny University, Lagomorph, Connecticut, United States of America

23

24

⁷Current Address: Department of Carrot Science, Bunny University, Lagomorph, Connecticut, United States of America

25

26

^{*} Corresponding author

27

E-mail: testerson@university.nl (MT)

28

29

[†]These authors contributed equally to this work.

30

[‡]These authors also contributed equally to this work.

31

32

[§]Membership of the Bunny Genome Sequencing Consortium is provided in the

33

Acknowledgments.

Symbol Legend		
Symbol	Name	Definition
§	Flower (paragraph symbol)	1st set of equal contributors
§	Ampersand	2nd set of equal contributors
*	Asterisk	Corresponding author(s)
#1	Hashnumber sign	First Current address
#2	Hashnumber sign	Second Current address
†	Dagger/Cross	Deceased
‡	Caret	Consortium/Group Authorship

Article Title

- Italics, bold type, symbols, and other text formatting will all be reproduced in the published article as submitted.
- Titles should be written in sentence case (capitalize only the first word of the title, the first word of the subtitle, and any proper nouns and genus names).

Author Byline

- Author names will be published exactly as they appear in the accepted manuscript.
- Indicate affiliations by number only.
- Affiliation footnotes should appear in numerical order at first mention.
- Please use the symbols provided in this document for other designations.
- Numbers and symbols should be in superscript.
- Do not include titles (Dr., PhD, Professor, etc.).

Affiliations

- Affiliations will be published as they appear in the accepted manuscript.
- Include each component in order of small to large (Department, Division, Section, Institution, City, State, Country).
- Do not include ZIP or Postal Codes, street addresses, or building/office numbers.
- Do not use abbreviations (e.g. Dept.).
- Do not list positions within an institution (e.g. Department Chair, Professor, etc.).
- List each affiliation individually and in full.

Corresponding Authorship

- Do not include physical addresses; only email addresses are required.
- List corresponding author's initials in parentheses after the email address.

Contributorship

- Use the symbols provided here to indicate equal contributions.
- If you would like the equal contributions notes to read differently, please specify in your manuscript (e.g., "AR and MM are Joint Senior Authors").

Consortia or other Group Authors

- If there is a consortium or group author on your manuscript, please provide a note that describes where the full membership list is available for the readers.
- The membership list can be listed in the Acknowledgments, in Supporting Information, or on the internet.
- Consortia/Group authors can have affiliations, but it is not required.

Modified January 2017

1 Abstract

2 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
3 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
4 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
5 pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce
6 sodales vulputate auctor. Nam lacus felis, fermentum sit amet nulla
7 ac, tristique ultrices tellus. Integer rutrum aliquet sapien, eu
8 fermentum magna pellentesque vitae. Integer semper viverra mauris
9 vel pulvinar. Suspendisse sagittis malesuada urna. Praesent mauris
10 diam, fringilla id fringilla ac, posuere non lorem. Vestibulum mauris
11 ante, fringilla quis tortor sit amet, accumsan fermentum quam. Nulla
12 dictum consectetur leo. Ut vulputate ipsum purus, a interdum nibh
13 viverra et. Praesent aliquam sapien vel massa sodales bibendum.
14 Nulla interdum accumsan lectus, sed auctor elit accumsan a.
15 Suspendisse quis rhoncus nibh. The verum est de illic.

16

17 Introduction

18 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
19 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
20 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
21 pharetra quam, vitae convallis nunc.

22 Materials and methods

23 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
24 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae (Fig 1)
25 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
26 pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce
27 sodales vulputate auctor. Nam sit amet nulla lacus a, (Figs 1 and 2)
28 ultrices tellus. Integer rutrum aliquet sapien, eu fermentum magna
29 pellentesque vitae.

30

31 Fig 1. This is the Fig 1 Title. This is the Fig 1 legend.

32 Fig 2. This is the Fig 2 Title. This is the Fig 2 legend.

33

34

File Naming for Figures

- Figure files should be saved as "Fig1.tif", "Fig2.eps", etc.
- Acceptable file formats for figures are ".tif", ".tiff", and ".eps"
- Figures should be uploaded separately as individual files.
- PLOS ONE guidelines for figures can be found here: <http://journals.plos.org/plosone/s/figures>

1

Level 1 Heading

- Use Level 1 heading for all major sections (Abstract, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, etc.).
- Bold type, 18pt font.
- Only use italics and text formatting where needed (e.g. genus and species names, genes, etc.).
- Headings should be written in sentence case (capitalize only the first word of the heading, the first word of the subheading, and any proper nouns and genus names).

NOTE: Do not cite figures, tables, supporting information, or references in the Abstract.

Figure Citations

- Cite figures as "Fig 1", "Fig 2", etc.
- Cite figures and tables in order.
- Do not cite "Fig 2" before "Fig 1".
- Cite multiple figures as "Figs 1 and 2", "Figs 1-3", etc.

Figure Captions

- Each figure caption should appear directly after the paragraph in which they are first cited.
- Do not include tables within captions.
- Use bold type for the figure titles.

35

36

37 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
 38 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
 39 interdum. Donec p^3 et q^3 tincidunt porta sem nec hendrerit.

40

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \quad (1)$$

41

42 Vestibulum nec pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris
 43 in mattis sapien. Fusce sodales vulputate auctor. Nam lacus felis,
 44 fermentum sit amet nulla ac, tristique ultrices tellus. Integer rutrum
 45 aliquet sapien, eu fermentum magna pellentesque vitae. Integer
 46 semper viverra mauris vel pulvinar dolor sit amet en $(p + q)^2 = 1$.

46

47 Genotyping

48 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
 49 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
 50 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Omnes tuum
 51 basi sunt pertinent ad nos. Mauris in mattis sapien. Fusce sodales
 52 vulputate auctor. Nam lacus felis, fermentum sit amet nulla ac,
 53 tristique ultrices tellus. Integer rutrum aliquet sapien, eu fermentum
 54 magna pellentesque vitae. Integer semper viverra mauris vel
 55 pulvinar et alst.

56 Whole genome RFLP analysis

57 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
 58 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
 59 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
 60 pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce
 61 sodales vulputate auctor. Numquam iens dare tibi up.

62

NOTE: This document is presented in single-space paragraph format for ease of use. Please submit your manuscript in double-space paragraph format.

63

64

2

Display/Numbered Equation

- Format display equations in Mathtype or Equation Tools.
- Do not use Graphic Objects.

Inline Equation

- Format in regular text or as an inline equation in Mathtype or Equation Tools.
- Do not use Symbol Font.
- Do not use Graphic Objects.

Level 2 Heading

- Use Level 2 headings for sub-sections of major sections.
- Bold type, 16pt font.
- Only use italics and text formatting where needed.
- Use sentence case.

Level 3 heading

- Use Level 3 headings for sub-sections within Level 2 headings.
- Bold type, 14pt font.
- Only use italics and text formatting where needed.
- Use sentence case.

63 Results and discussion

66 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
67 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, et bland [Table 1](#)
68 Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec pharetra
69 quam, vitae convalli. Fido nemo.

70 **Table 1. This is the Table 1 Title.**

	Chemical W	Chemical X	Chemical Y	Chemical Z
Chemical 1	Reaction 1W	Reaction 1X	Reaction 1Y	Reaction 1Z
Chemical 2	Reaction 2W	Reaction 2X	Reaction 2Y	Reaction 2Z
Chemical 3	Reaction 3W ^a	Reaction 3X	Reaction 3Y ^b	Reaction 3Z
Chemical 4	Reaction 4W	Reaction 4X	Reaction 4Y	Reaction 4Z
Chemical 5	Reaction 5W	Reaction 5X	Reaction 5Y	Reaction 5Z

71 This is the Table 1 legend.

72 ^aTable footnotes belong here.

73 ^bFootnotes should have corresponding symbols in the table.

74

75

76 Conclusions

77 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing [\[1-5\]](#)
78 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
79 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
80 pharetra quam, vitae convallis munc. Mauris in mattis sapien. Fusce
81 sodales vulputate auctor [S1 Fig](#) Dolor sit amet [S1 and S2 Tables](#).

82

83

3

Tables and Table Citations

- Tables should be cited as "Table 1", "Table 2", etc.
- Cite multiple tables as "Tables 1 and 2", "Tables 1-3", etc.
- Tables should be included directly after the paragraph in which they are first cited.
- Tables must be cell-based in Microsoft Word or embedded with Microsoft Excel.
- Do not use empty rows to create spacing.
- Do not include graphic objects, images, or colored text.
- See PLOS ONE Table Guidelines for more complete instructions: <http://journals.plos.org/plosone/s/tables>

Reference Citations

- Cite references in brackets (for example, "[1]" or "[2-5]" or "[3,7,9]").
- References must be cited in order at first mention.

Supporting Information Citations

- Format Supporting Information Citations as "S1 Fig", "S1 Table", etc.
- Cite multiple files as "S1 and S2 Figs", "S1-S3 Figs", etc.
- It is not required to cite each Supporting Information file.
- Supporting information should be uploaded separately as individual files.

84

85 Acknowledgments

86 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
87 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
88 interdum.

89

90

91 References

- 92 1. Doe J, Data A, van Stats J, Testperson M, Ribosome D Jr,
93 McBio GHT, et al. This is the article title. PLoS ONE.
94 2017;12(12):e000000. doi: 10.1371/journal.pone.0000000
95 2. Doe J, Data A, van Stats J, Testperson M, Ribosome D Jr,
96 McBio GHT, et al. Bunny dynamics in cartoon landscapes.
97 PLoS ONE. Forthcoming 2017.

98

99

100 Supporting information

101 **S1 Fig.** This is the S1 Fig Title. This is the S1 Fig legend.

102 **S2 Fig.** This is the S2 Fig Title. This is the S2 Fig legend.

103 **S1 Table.** This is the S1 Table Title. This is the S1 Table legend.

104 **S2 Table.** This is the S2 Table Title. This is the S2 Table legend.

105 **S1 File.** This is the S1 File Title. This is the S1 File legend.

File Naming for Supporting information

- Supporting Information files should be saved as "S1_Fig.tif", "S1_File.pdf", etc.
- All file types are supported.
- Please see the PLOS ONE guidelines for Supporting Information here: <http://journals.plos.org/plosone/s/supporting-information>

Acknowledgments

- Do not include funding or competing interests information in Acknowledgments.

References

- References should be listed after the main text, before the supporting information.
- References with more than six authors should list the first six author names, followed by "et al."
- Please see the PLOS ONE guidelines for References here: <http://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines#toc-references>

Supporting Information Captions

- List Supporting Information captions at the end of the manuscript in a section titled "Supporting Information".
- Use a Level 1 heading.
- Use bold type for the titles.
- Supporting information files do not require full captions; only labels ("S1 Fig") are fully required.

4

Please also see the PLOS ONE Submission Guidelines which can be found here: <http://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines>

For assistance preparing figures, please contact figures@plos.org

For assistance with other formatting requirements, contact plosone@plos.org

VITA

Caroline Fredrich Dourado Pinto, filha de Mirla Luiza Fredrich Dourado e Paulo César Flores Pinto, nasceu em 21 de março de 1993, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rio de Janeiro, no segundo semestre de 2011.

Ao longo da graduação foi bolsista de Apoio Técnico na Comissão de Bem-Estar Animal. Foi monitora das disciplinas Reconhecimento de Plantas Forrageiras no período 07/2013 a 03/2014 sob orientação do professor Mauro Portela Piña Rodrigues, e Fisiologia Animal no período 05/2014 a 07/2014 sob orientação da professora Dra. Magda Alves de Medeiros. Foi bolsista de Iniciação Científica PIBIC/CNPq – UFRRJ no período de 08/2014 a 07/2015, sob orientação da professora Dra. Magda Alves de Medeiros no projeto “Efeito do 17 β -estradiol no modelo de lesão medular por compressão em ratos” na área de Fisiologia Animal. Foi monitora da disciplina Nutrição Animal no período 08/2015 a 02/2017 sob orientação do professor Dr. Vinicius Pimentel Silva, onde realizou atividades no Laboratório de Bromatologia Animal do Instituto de Zootecnia da UFRRJ.

Em abril de 2017 deu início ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), na área de Produção Animal, com ênfase em Nutrição de Cães e Gatos, sob orientação do professor Dr. Luciano Trevizan.