

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



AVALIAÇÃO DO MICROBIOMA ORAL EM COELHOS (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*) COM
E SEM DOENÇA DENTÁRIA

FRANCISCO SERRA E SOUSA ALMEIDA

ORIENTADORA:
Mestre Ana Teresa Severino Caldeira
Reisinho
COORIENTADORA:
Doutora Maria Manuela Castilho
Monteiro de Oliveira

2025

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



AVALIAÇÃO DO MICROBIOMA ORAL EM COELHOS (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*) COM
E SEM DOENÇA DENTÁRIA

FRANCISCO SERRA E SOUSA ALMEIDA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Sandra de Oliveira Tavares de
Sousa Jesus

VOGAIS:

Doutora Eva Sofia Gonçalves da Cunha
Mestre Ana Teresa Severino Caldeira
Reisinho

ORIENTADORA:

Mestre Ana Teresa Severino Caldeira
Reisinho

COORIENTADORA:

Doutora Maria Manuela Castilho
Monteiro de Oliveira

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Francisco Serra e Sousa Almeida

Título da Tese ou Dissertação: Avaliação do Microbioma Oral de Coelho (Oryctolagus cuniculus) com e sem Doença Dentária

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2025

Designação do curso de Mestrado ou de Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica Produção Animal e Segurança Alimentar
 Morfologia e Função Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Elaboração de artigo científico relativo ao trabalho exposto nesta dissertação para submissão em revista internacional.

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 2 de maio de 2025

Assinatura: Francisco Serra e Sousa Almeida Anabela Reisinho (indicar aqui a data da realização das provas públicas)
C 0343

Agradecimentos

Um forte agradecimento à Dra. Ana Teresa Reisinho, que não só esteve na origem do tema desta dissertação, como também me acompanhou durante o meu estágio curricular e partilhou toda a sua experiência e conhecimento no que toca à medicina de animais exóticos.

À professora Manuela Oliveira, que aceitou coorientar este trabalho, devo-lhe um grande agradecimento pela disponibilidade constante que teve para mim e para todos os outros alunos que recorrem a si para os aconselhar, pela eficácia, pelo profissionalismo e, não menos importante, pelo financiamento que providenciou para a concretização deste trabalho.

À equipa da TecnoLabs - FCUL, em particular à Dra. Mónica Nunes, agradeço a disponibilidade, simpatia e paciência ao responder a todas as questões que me foram surgindo (por mais simples que fossem) ao longo da realização desta dissertação.

Ao Hospital Escolar Veterinário da Universidade de Lisboa, que tive o prazer de chamar de casa durante os 6 meses do meu estágio curricular, onde conheci médicos, enfermeiros e auxiliares veterinários que tenho hoje o prazer de chamar amigos. Agradeço a todos a simpatia, os ensinamentos partilhados, a entajuda constante e, acima de tudo, o ambiente acolhedor que tornou cada dia mais leve e enriquecedor.

Agradeço à equipa da Exoclinic, em especial à Dra. Cristina Almeida, bem como à equipa da Vetexóticos, pela disponibilidade e colaboração incansáveis. Sem este apoio, não teria sido possível alcançar o número total de amostras previsto.

À minha mãe, devo o maior obrigado de todos! Que sempre acreditou em mim desde o início do meu percurso e esteve sempre presente, nos bons e nos maus momentos. Um obrigado também ao meu pai, avós, tios e primos.

André, Vasco e Miguel, o quarteto fantástico que tornou esta experiência inesquecível, sem vocês teria sido tudo muito mais difícil, que a nossa amizade seja eterna. Desejo-vos a maior das felicidades. Nunca desistam dos vossos sonhos.

Aos meus amigos de Campo de Ourique, sei que não aprenderam nada com os palavrões que vos fui ensinando, mas sei que sabem a importância deste momento e obrigado por terem feito parte desta jornada.

À Joana, que apesar de ter aparecido na minha vida há pouco tempo, deu-me a força e o apoio que eu precisava para terminar este curso em grande.

Por fim, mas não menos importante, quero agradecer ao Spott, que apesar de nunca vir a ler isto, foi a verdadeira motivação que me fez nunca olhar para trás e perseguir este meu sonho de me tornar médico veterinário.

AVALIAÇÃO DO MICROBIOMA ORAL EM COELHOS (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*) COM E SEM DOENÇA DENTÁRIA

Resumo

As doenças dentárias são frequentes em coelhos domésticos, podendo afetar cerca de 15% dos animais e comprometendo gravemente o seu bem-estar. Embora a microbiota bacteriana oral desta espécie já tenha sido descrita, as alterações do microbioma associadas à doença dentária permanecem pouco esclarecidas.

Este estudo teve como objetivo caracterizar e comparar o microbioma oral do coelho doméstico através da sequenciação de terceira geração (Oxford Nanopore®) do gene 16S rDNA. Foram analisadas amostras da mucosa oral de 27 animais, divididos equitativamente por três grupos: coelhos saudáveis (n=9), com doença dentária (n=9) e com abscesso dentário (n=9). Foi avaliada a diversidade microbiana (alfa e beta) e a composição taxonômica em cada grupo, identificando diferenças significativas associadas à presença de doença oral. Apesar das amostras de cada coelho doente apresentarem uma redução estatisticamente significativa da diversidade microbiana oral, a diversidade total de espécies bacterianas encontradas em todos os coelhos doentes combinados foi maior do que nos coelhos saudáveis. Esta aparente contradição foi explicada pela diversidade beta, que demonstrou que a composição da comunidade microbiana variou mais entre coelhos doentes do que entre coelhos saudáveis. Nos coelhos saudáveis predominaram os gêneros *Bibersteinia* e *Rodentibacter* (20,25% e 13,05%, respectivamente), enquanto os coelhos com doença dentária apresentaram um microbioma dominado por bactérias oportunistas. Em particular, registou-se um aumento marcado de *Streptococcus* (16,21%) e de anaeróbios estritos nos grupos com doença avançada, nomeadamente *Porphyromonas* (de 0,6% nos saudáveis para >7% nos doentes). Contudo, a presença de *Streptococcus* diminuiu acentuadamente nos casos de abscesso (2,51%). A análise de diversidade beta mostrou a ocorrência de perfis microbianos distintos entre grupos: os coelhos saudáveis exibiram microbiomas mais homogêneos entre si, ao passo que os animais com algum tipo de alteração dentária apresentaram maior heterogeneidade, evidenciando alterações na estrutura da comunidade microbiana associadas à progressão da doença.

Estes resultados demonstram que a doença dentária em coelhos está associada a alterações significativas no microbioma oral e sugerem potenciais biomarcadores microbianos para o diagnóstico e intervenção terapêutica nas doenças dentárias em coelhos.

Palavras-chave: Coelho doméstico; doença dentária; abscesso odontogênico; microbioma oral; sequenciação de terceira geração.

ASSESSMENT OF THE ORAL MICROBIOME IN RABBITS (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*) WITH AND WITHOUT DENTAL DISEASE

Abstract

Dental disease is a very common and significant condition in pet rabbits, affecting approximately 15% of individuals and severely impacting their well-being. Although the oral bacterial microbiota of this species has been described, the microbial changes associated with dental disease remain poorly understood.

This study aimed to characterize and compare the oral microbiome of pet rabbits using long-read 16S rDNA sequencing (Oxford Nanopore®). Analysis focused on oral mucosal samples from 27 animals, divided equally into three groups: healthy rabbits (n=9), rabbits with dental disease (n=9), and rabbits with odontogenic abscesses (n=9). Microbial diversity (alpha and beta) and taxonomic composition were assessed in each group, revealing significant differences associated with oral disease. Despite each diseased rabbit sample exhibiting a statistically significant reduction in oral microbial diversity, the overall diversity of bacterial species identified across all diseased rabbits combined was greater than that observed in healthy rabbits. This apparent contradiction was elucidated by beta diversity, which demonstrated greater heterogeneity in microbial community composition among diseased rabbits compared to healthy controls. The predominant genera in healthy rabbits were *Bibersteinia* and *Rodentibacter* (20,25% e 13,05%, respectively), whereas rabbits with dental disease exhibited a microbiome dominated by opportunistic bacteria. Specifically, a sharp increase in *Streptococcus* was detected in the group of animals with dental disease (16,21%), and an overgrowth of strict anaerobes was evident in animals with advanced disease, notably *Porphyromonas* (rising from 0.6% in healthy to over 7% in diseased groups). Conversely, *Streptococcus* abundance dropped drastically in abscess cases (2,51%). Beta-diversity analysis revealed distinct microbial profiles between groups: healthy rabbits showed a cohesive microbiome cluster, while rabbits with some kind of dental disease displayed greater intra-group variability. These patterns indicate a restructuring of the oral microbial community with disease progression.

These findings demonstrate that dental disease in pet rabbits is associated with significant changes in the oral microbiome and suggest potential microbial biomarkers for diagnosis and therapeutic intervention in rabbit dental diseases.

Keywords: Domestic rabbit; dental disease; odontogenic abscess; oral microbiome; third generation sequencing.

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iv
Abstract	v
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Figuras	x
Lista de Gráficos	xi
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xii
I- Introdução	1
II- Descrição do Estágio Curricular	2
III- Revisão Bibliográfica.....	3
1. Anatomia e Fisiologia da Cavidade Oral do Coelho.....	3
1.1. Estrutura Geral e Dentição	3
1.2. Fisiologia do Crescimento e Desgaste dos Dentes	5
1.3. Influência da Dieta e Implicações para a Saúde Oral.....	6
2. Doenças Dentárias em Lagomorfos	8
2.1. Introdução às Doenças Dentárias em Lagomorfos	8
2.2. Etiologia e Patogênese das Doenças Dentárias	9
2.3. Principais Tipos de Doenças Dentárias	11
2.3.1. Conceitos Gerais	11
2.3.2. Abscessos Dentários.....	13
2.4. Abordagens Terapêuticas e Maneio	15
2.4.1. Tratamento da Doença Dentária em Coelhos	16
2.4.2. Abordagem Clínica aos Abscessos Odontogênicos	16
2.4.3. Maneio Pós-tratamento e Acompanhamento	18
3. Microbiota e Microbioma Oral.....	19

3.1.	Definição e Importância da Microbiota Oral	19
3.2.	Composição do Microbiota Oral em Mamíferos	21
3.3.	Fatores que Influenciam a Microbiota Oral.....	23
4.	Técnicas de Sequenciação para Estudo do Microbioma.....	24
4.1.	Introdução às Técnicas de Sequenciação para Estudo do Microbioma	24
4.2.	Evolução das Técnicas de Sequenciação de DNA e sua Aplicação na análise do Microbioma.....	24
4.3.	Sequenciação de Terceira Geração e Long-read Sequencing	26
4.4.	Análise Bioinformática e Classificação Taxonómica	27
4.5.	Comparação entre Técnicas de Sequenciação para análise do Microbioma	28
IV-	AVALIAÇÃO DO MICROBIOMA ORAL EM COELHOS (<i>ORYCTOLAGUS CUNICULUS</i>) COM E SEM DOENÇA DENTÁRIA.....	29
1.	Material e Métodos	29
1.1.	Considerações éticas	29
1.2.	População alvo	29
1.3.	Recolha de Amostras	29
1.4.	Caracterização do Microbioma	30
1.4.1.	Processamento das Amostras	30
1.4.2.	Amplificação do Gene 16S rDNA e Preparação da Biblioteca para Sequenciação.....	31
1.5.	Tratamento dos Dados e Análise Estatística.....	32
1.6.	Avaliação da Qualidade da Sequenciação.....	34
2.	Resultados	35
2.1.	Avaliação da Qualidade da Sequenciação.....	35
2.2.	Caracterização da População em Estudo	36
2.3.	Diversidade Taxonómica	37
2.4.	Abundância Relativa	38
2.5.	Core Microbiota	40
2.6.	Análise da Diversidade	41
2.6.1.	Diversidade Alfa	41

2.6.2. Diversidade Beta	45
2.7. Análise Discriminante Linear.....	46
3. Discussão.....	49
3.1. Diversidade microbiana e composição taxonómica.....	50
3.1.1. Diversidade alfa: redução da riqueza microbiana e impacto da disbiose	50
3.1.2. Diversidade beta: dissimilaridade entre o microbioma dos três grupos de animais em estudo.....	51
3.1.3. Composição taxonómica e diferenças na abundância relativa dos filos e géneros bacterianos	53
3.2. Identificação de biomarcadores microbianos	57
3.3. Implicações Clínicas	60
3.4. Limitações do Estudo	63
4. Conclusão	63
5. Referências Bibliográficas	65
6. Anexos	71
Anexo 1. Consentimento Informado	71
Anexo 2. Inquérito Epidemiológico Realizado aos Tutores	72
Anexo 3. Resultados do Inquérito Epidemiológico.....	74

Lista de Tabelas

Tabela 1. Quantificação do DNA extraído a partir das amostras da cavidade oral dos coelhos em estudo.	31
Tabela 2. Índice de qualidade e exatidão na leitura de bases	35
Tabela 3. Core microbiota da cavidade oral dos animais em estudo.....	41
Tabela 4. Comparações individuais entre os grupos de amostras, realizadas através do teste de Kruskal-Wallis, com um nível de significância estabelecido em $p \leq 0,05$	42

Lista de Figuras

Figura 1. Anatomia do crânio do coelho, vista lateral. Adaptado de McCracken e Kainer (2008).....	3
Figura 2. Anatomia de um dente molariforme de um coelho. Adaptado de Harcourt-Brown (2013).....	4
Figura 3. Representação esquemática das componentes verticais e horizontais dos movimentos mastigatórios em função do tipo de alimento ingerido. Alimentos fibrosos, como por exemplo o feno e vegetais frescos, induzem movimentos mastigatórios predominantemente laterais, com menor amplitude vertical. Em contrapartida, alimentos concentrados e granulados, como as pellets, promovem um padrão de mastigação com maior componente vertical e movimentos laterais mais reduzidos. Adaptado de Capello e Gracis (2005).....	7
Figura 4. Comparação entre crânio de um coelho dolicocefálico (à esquerda) e o crânio de dois coelhos braquicefálicos (ao centro e à direita). Adaptado de Harvey et al. (2019).	9
Figura 5. Imagem original de uma tomografia computadorizada (TC) com reconstrução 3D da cabeça de um coelho doméstico, evidenciando lesões compatíveis com abscessos dentários. Observa-se um abscesso mandibular direito, com envolvimento dos dentes 405 (PM1), 406 (PM2) e 407 (M1), associado a destruição óssea mandibular e formação de massa encapsulada. Na maxila direita, é visível uma área hipodensa compatível correspondente a um abscesso a envolver os dentes 109 (M1) e 110 (M2).	11
Figura 6. Exemplos de doença dentária em coelhos. À esquerda um coelho com uma úlcera lingual causada por uma espícula e à direita espícula dentária direcionada para a superfície lingual.....	12
Figura 7. Comparação entre tecnologias de sequenciação de short reads e long reads. À esquerda, a abordagem de short reads fragmenta o genoma em milhares de peças, dificultando uma montagem precisa. À direita, a tecnologia de long reads permite a reconstrução genómica com muito menos fragmentos e facilita a análise da estrutura genómica e a identificação de variantes complexas. Criado com BioRender.com.....	27
Figura 8. Imagem original do material de recolha e preservação das amostras: recipiente com meio de conservação Virus Preservation Medium e 2 zaragatoas orais (Virus Collection and Preservation System).	30
Figura 9. Pipeline analítico utilizado na caracterização do microbioma da cavidade oral dos coelhos em estudo, utilizando long-read sequencing.	34

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Abundância relativa dos filos bacterianos presentes no microbioma oral dos coelhos em estudo.	39
Gráfico 2. Abundância relativa dos gêneros bacterianos presentes no microbioma oral dos coelhos em estudo.	40
Gráfico 3. Boxplot do Índice de Equitabilidade de Pielou aplicado aos três grupos de coelhos em estudo.	42
Gráfico 4. Curvas de rarefação relativas às OTUs observadas (à esquerda) e ao Índice de Shannon (à direita) nos diferentes grupos de coelhos: saudáveis (A), com doença dentária (B) e com abscesso dentário (C).	44
Gráfico 5. Gráfico PCoA baseado na matriz de distância de Jaccard. A laranja encontram-se representados os animais saudáveis, a azul os que apresentam doença dentária e a vermelho os com abscesso dentário.....	45
Gráfico 6. Análise diferencial da composição bacteriana do microbioma oral entre o grupo de coelhos saudáveis e de coelhos com doença dentária, determinada pela LEfSe. As barras representam os valores da Análise Discriminante Linear, indicando a magnitude da associação de cada grupo taxonômico com cada um dos grupos de coelhos.	47
Gráfico 7. Análise diferencial da composição bacteriana do microbioma oral entre o grupo de coelhos saudáveis e de coelhos com abscesso dentário, determinada pela LEfSe. As barras representam os valores da Análise Discriminante Linear, indicando a magnitude da associação de cada grupo taxonômico com cada um dos grupos de coelhos.	48
Gráfico 8. Análise diferencial da composição bacteriana do microbioma oral entre o grupo de coelhos com doença dentária e de coelhos com abscesso dentário, determinada pela LEfSe. As barras representam os valores da Análise Discriminante Linear, indicando a magnitude da associação de cada grupo taxonômico com cada um dos grupos de coelhos.	49

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ATM- Articulação temporomandibular

DNA - Ácido desoxirribonucleico

LCA- *Lowest common ancestor*

LDA- Análise Linear Discriminante

LEfSe- *Linear Discriminant Analysis Effect Size*

NGS- Sequenciação de nova geração

OTU- Unidade taxonómica operacional

p value - Valor de significância estatística

PCoA- Análise de Coordenadas Principais

PSADD- Síndrome de doença dentária adquirida progressiva

Q- Índice de qualidade de sequenciação

rDNA- DNA ribossomal

rRNA- RNA ribossomal

SBS- Sequenciação por síntese

TC- Tomografia Computorizada

WGS- *Whole-Genome Shotgun Sequencing*

I- Introdução

As doenças dentárias representam um dos processos patológicos mais comuns e clinicamente relevantes em coelhos domésticos (Berger 2023; Jackson et al. 2024). Estudos epidemiológicos sugerem que, anualmente, cerca de 15% dos coelhos de companhia apresentam doença dentária, podendo esta percentagem atingir valores superiores em algumas populações (Jackson et al. 2024). As alterações patológicas registadas variam desde más oclusões dentárias a abscessos odontogénicos, conduzindo frequentemente a dor intensa, perda de apetite e de peso, bem como outras complicações sistémicas que comprometem o bem-estar dos animais (Crossley 2003; Capello 2008).

O microbioma oral desempenha um papel fundamental na manutenção da saúde oral, contribuindo para a digestão, modulação imunológica e prevenção da colonização por agentes patogénicos (Zarco et al. 2012; Kilian et al. 2016). A perturbação deste ecossistema equilibrado pode resultar num desequilíbrio microbiano — fenómeno conhecido como disbiose — em que microrganismos benéficos diminuem e os oportunistas proliferam (Parahitiyawa et al. 2010; Deo e Deshmukh 2019). Em coelhos, por exemplo, géneros bacterianos comensais como *Streptococcus* e *Actinomyces* podem tornar-se patogénicos em contexto de disbiose, contribuindo para a formação de abscessos dentários (Tyrrell et al. 2002; Gardhouse et al. 2017).

A caracterização das comunidades microbianas orais tem sido potenciada pelos avanços nas técnicas de sequenciação de nova geração. As tecnologias de terceira geração, nomeadamente a Oxford Nanopore®, permitem sequenciar fragmentos de DNA longos (*long-read sequencing*), superando limitações anteriormente estabelecidas e fornecendo uma elevada resolução taxonómica na análise de microbiomas complexos (Goodwin et al. 2016; Oxford Nanopore Technologies 2018).

Face a esta realidade, torna-se pertinente aprofundar a caracterização do microbioma oral em coelhos com e sem doença dentária. Embora a microbiota oral desta espécie tenha sido descrita em alguns estudos recentes (Flenghi et al. 2023), persistem lacunas relativamente às alterações microbianas associadas às doenças dentárias. Assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar e comparar o microbioma oral de coelhos saudáveis e de coelhos com doença dentária, recorrendo à sequenciação de *long reads* (Oxford Nanopore®) para obter uma identificação microbiana de elevada precisão. Espera-se que esta abordagem permita identificar desequilíbrios microbianos associados às doenças orais estudadas e, desta forma, esclarecer o papel do microbioma na patogénese destes processos em coelhos, fornecendo bases para futuras estratégias de prevenção e intervenção clínica.

II- Descrição do Estágio Curricular

O meu estágio curricular decorreu no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, entre 4 de setembro de 2023 e 8 de março de 2024, completando um total de 27 semanas. Durante este período, para além dos turnos regulares de 7 a 8 horas, tive a oportunidade de acompanhar médicos e enfermeiros veterinários em turnos de internamento de urgência noturna de 12 horas.

Na primeira metade do estágio, integrei um regime de rotações pelos diversos serviços hospitalares, o que me permitiu desenvolver competências práticas e aprofundar conhecimentos em várias áreas da Medicina Veterinária. Em Medicina Geral, colaborei em consultas e procedimentos básicos; em Imagiologia (Radiografia, Tomografia Computorizada e Ecografia), participei no posicionamento de animais e acompanhei a realização e interpretação preliminar dos exames; em Cirurgia, realizei procedimentos simples, monitorizei anestésias e prestei cuidados pós-operatórios; e, em Medicina Interna, acompanhei o desenvolvimento de casos clínicos complexos, o internamento de animais e a colheita e análise de amostras. Paralelamente, tive contacto com outras especialidades, como Oncologia, Cardiologia, Dermatologia e Oftalmologia, onde observei e participei em consultas e exames específicos de cada área.

A segunda metade do estágio foi inteiramente dedicada ao serviço de Medicina de Novos Animais de Companhia, sob a supervisão da Dra. Ana Teresa Severino Caldeira Reisinho. Durante este período, aprofundei competências práticas em diversas espécies, participando na assistência técnica a consultas de rotina, que incluíram a aplicação de técnicas de contenção adequadas, a realização de cuidados específicos de manejo, administração de medicação, entre outros. Adicionalmente, acompanhei e monitorizei procedimentos cirúrgicos e pós cirúrgicos adaptados aos novos animais de companhia. Paralelamente, colaborei ativamente na recolha de amostras da mucosa oral de coelhos, uma parte integrante de um projeto de investigação que visou a avaliação do microbioma oral em coelhos com e sem doença dentária, contribuindo assim para a ciência veterinária.

Ao longo do estágio, adquiri competências práticas em várias áreas da medicina veterinária de animais de companhia, com especial destaque para os novos animais de companhia. Paralelamente, colaborei na recolha de amostras da mucosa oral de coelhos, inserida no projeto de investigação desenvolvido, cuja finalidade foi a avaliação do microbioma oral em coelhos com e sem doença dentária.

III- Revisão Bibliográfica

1. Anatomia e Fisiologia da Cavidade Oral do Coelho

1.1. Estrutura Geral e Dentição

O coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*), descendente do coelho-bravo, apresenta uma estrutura oral plenamente adaptada às exigências da sua alimentação herbívora, incluindo uma dentição elodonte (dentes de crescimento contínuo e sem raiz anatômica) e hipsodonte (coroas clínicas longas), características essenciais para suportar o desgaste provocado por uma dieta altamente abrasiva (Böhmer 2015; Donnelly e Vella 2016).

Os lagomorfos, ordem taxonômica a que pertencem os coelhos, são classificados como difiodontes, apresentando duas fases de dentição bem definidas: uma fase decídua, conhecida como dentição de leite, e uma fase definitiva. Esta particularidade diferencia-os dos roedores, que possuem apenas uma única dentição definitiva (Michaeli et al. 1980). A dentição decídua, que se desenvolve durante a vida fetal e é substituída logo após o nascimento, pode ser descrita pela fórmula dentária $2 (I 2/1, C 0/0, PM 3/2, M 0/0) = 16$. Já a dentição permanente, que surge durante as primeiras 5 semanas de idade, é representada pela fórmula $2 (I 2/1, C 0/0, PM 3/2, M 3/3) = 28$ (Harcourt-Brown e Chitty 2013). Uma outra característica particular dos coelhos reside na presença de duas fileiras de incisivos maxilares, uma particularidade designada por duplicitentata. Os "peg teeth", também conhecidos como incisivos auxiliares, são pequenos dentes localizados por trás dos incisivos principais, cuja função específica permanece pouco esclarecida (Böhmer 2015). Os coelhos não possuem dentes caninos e entre os incisivos e os pré-molares existe um espaço denominado diastema, que constitui uma característica anatômica típica da espécie (Donnelly e Vella 2016) (figura 1).

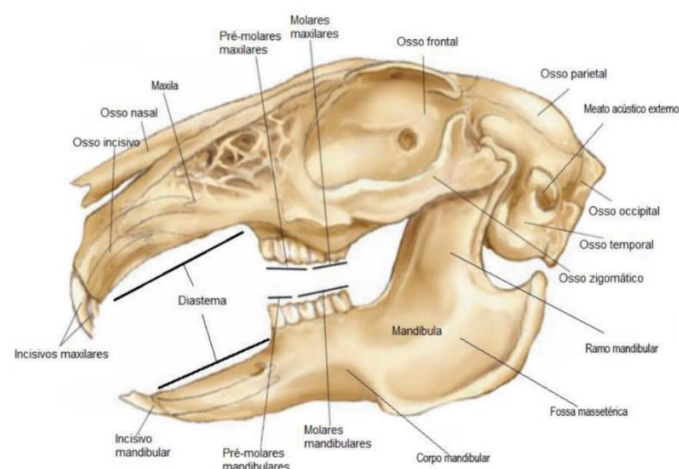


Figura 1. Anatomia do crânio do coelho, vista lateral. Adaptado de McCracken e Kainer (2008).

Nos incisivos superiores, o esmalte reveste exclusivamente a superfície labial, enquanto nos incisivos inferiores está presente tanto nas superfícies labial como lingual, criando uma superfície oclusal afiada e funcional, essencial para o corte eficiente da vegetação. O alinhamento preciso entre os incisivos maxilares e mandibulares é uma adaptação fundamental, que facilita o corte eficaz de alimentos vegetais (Donnelly e Vella 2016) e permite o desgaste constante dos incisivos, mantendo-os funcionais (Müller et al. 2014; Böhmer 2015).

Os molariformes, ou “cheek teeth” (designação dada ao conjunto dos dentes pré-molares e molares, morfologicamente indistintos nestes animais), constituem uma unidade funcional adaptada à trituração de fibras vegetais, desempenhando um papel fundamental no processamento mecânico dos alimentos (Verstraete e Osofsky 2005). Estes dentes possuem uma superfície oclusal contínua, onde se observam pregas de esmalte e dentina nas superfícies bucal e lingual (figura 2) Esta configuração aumenta a área de contacto, contribuindo significativamente para a eficiência do processo mastigatório (Böhmer 2015).

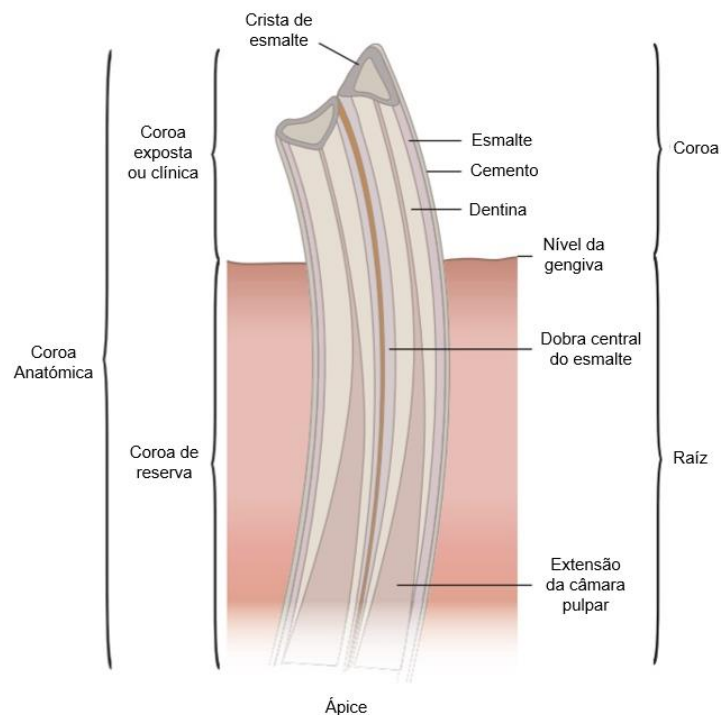


Figura 2. Anatomia de um dente molariforme de um coelho. Adaptado de Harcourt-Brown (2013).

Os coelhos possuem uma arcada dentária superior mais larga que a inferior – situação designada de anisognatia (Verstraete e Osofsky 2005) – e esta particularidade anatómica desempenha um papel crucial na eficiência da mastigação, ao possibilitar o movimento lateral necessário para a trituração eficaz das fibras vegetais (Verstraete e Osofsky 2005; Böhmer 2015). Durante o movimento mastigatório, a anisognatia promove o contacto assimétrico entre

os dentes maxilares e mandibulares, assegurando um desgaste uniforme e funcional da dentição (Müller et al. 2014). Esta adaptação é crucial para o processamento de dietas fibrosas, caracterizadas por alto teor de celulose (Harcourt-Brown 2013) e exerce uma influência direta sobre a biomecânica da articulação temporomandibular (Crossley 2003).

A articulação temporomandibular (ATM) dos coelhos, ao contrário de espécies carnívoras ou omnívoras, apresenta uma conformação única e é altamente especializada para permitir movimentos mastigatórios amplos e laterais (Arzi e Staszuk 2019). Localizada dorsalmente em relação à linha oclusal, esta articulação possibilita movimentos básicos, como abertura e fecho, retração caudo-dorsal, protrusão rostral, e um movimento lateral complexo, que facilita a interação entre as superfícies oclusais durante o processo mastigatório. A ATM possui uma superfície articular plana, com uma estrutura condilar que possibilita um deslocamento lateral significativo, essencial para a mastigação de alimentos fibrosos (Crossley 2003). Este movimento é realizado com um ângulo oclusal de aproximadamente 10 graus (Verstraete e Osofsky 2005), permitindo uma mastigação lateral eficiente a cerca de 200 ciclos por minuto (Meredith e Lord 2014). Esta velocidade é facilitada por uma articulação que permite movimentos de rotação e translação simultâneos, otimizando a eficiência energética do processo de trituração das fibras vegetais (Crossley 2003; Verstraete e Osofsky 2005). Durante o movimento mastigatório, cada dente mandibular, com exceção dos primeiros e últimos molares, entra em contacto com dois dentes maxilares opostos, maximizando a trituração dos alimentos e garantindo um desgaste homogêneo, essencial para a manutenção da integridade funcional da dentição (Verstraete e Osofsky 2005).

A mastigação dos coelhos está intimamente associada ao tipo de alimento ingerido (Böhmer 2015). Alimentos fibrosos, como gramíneas e plantas ricas em celulose, requerem movimentos mastigatórios amplos e laterais, que são facilitados pela conformação da ATM e pela anisognatia (Crossley 2003; Donnelly e Vella 2016). Durante o processo de mastigação de fibras vegetais, ocorre uma abrasão intensa na superfície dos dentes, promovendo um desgaste uniforme e contínuo (Crossley 2003), fundamental para prevenir o crescimento excessivo da dentição elodonte (Böhmer 2015).

1.2. Fisiologia do Crescimento e Desgaste dos Dentes

Os coelhos apresentam uma dentição de crescimento contínuo, com uma taxa de crescimento de aproximadamente 2 mm por semana para os incisivos maxilares, 2,4 mm por semana para os incisivos mandibulares e 3 mm por mês para os dentes molariformes (Meredith e Lord 2014), uma adaptação fundamental para compensar o desgaste elevado associado à mastigação de alimentos fibrosos e abrasivos, como os fitólitos de sílica presentes nas gramíneas (Müller et al. 2014). O crescimento dentário resulta da atividade

celular nos ápices dos dentes, onde ameloblastos e odontoblastos produzem esmalte e dentina de forma contínua (Harcourt-Brown 2013). Esta particularidade anatômica garante um equilíbrio entre o crescimento e o desgaste natural, prevenindo tanto o sobrecrecimento como o desgaste excessivo dos dentes (Harcourt-Brown 2013; Müller et al. 2014). Contudo, em coelhos domésticos alimentados com dietas comerciais pobres em elementos abrasivos, o desgaste torna-se insuficiente para compensar o crescimento dentário, levando a problemas como má oclusão e crescimento excessivo (Meredith e Lord 2014).

1.3. Influência da Dieta e Implicações para a Saúde Oral

A dieta dos coelhos desempenha um papel determinante na manutenção da saúde dentária, garantindo o equilíbrio entre o desgaste e o crescimento contínuo dos dentes (Crossley 2003). No seu habitat natural, a alimentação dos coelhos é composta principalmente por gramíneas e plantas ricas em fibras e sílica, o que assegura um desgaste constante e equilibrado dos dentes (Donnelly e Vella 2016). Esta dieta promove movimentos mastigatórios amplos e laterais, facilitados pela conformação da ATM e pela anisognatia. O conteúdo abrasivo das gramíneas, aliado à sua consistência dura, contribui para o desgaste natural, prevenindo o sobrecrecimento dentário e problemas como más oclusões (Crossley 2003; Donnelly e Vella 2016).

Por outro lado, dietas à base de ração e cereais apresentam menor abrasividade e exigem uma menor quantidade e amplitude nos movimentos laterais durante a mastigação (Berger 2023) (figura 3). As diferenças na biomecânica mastigatória podem resultar num desgaste insuficiente e não uniforme dos dentes, conduzindo ao crescimento anormal, desalinhamento e problemas de oclusão (Crossley 2003; Donnelly e Vella 2016). A textura mais macia de certos alimentos reduz também a necessidade de ciclos mastigatórios prolongados, diminuindo a estimulação natural da ATM e comprometendo a eficiência do sistema mastigatório (Berger 2023). Estas alterações aumentam o risco de formação de espículas – saliências pontiagudas que podem causar lesões nos tecidos moles da cavidade oral (Crossley 2003) – e de má oclusão, problemas que podem evoluir para situações mais graves, como abscessos e outras complicações dentárias (Donnelly e Vella 2016). Deste modo, uma dieta rica em alimentos fibrosos é indispensável, não apenas para a manutenção da saúde dentária (Martins et al. 2002), mas também para assegurar a eficiência dos movimentos mastigatórios e o funcionamento ideal do sistema digestivo dos coelhos (Crossley 2003). Para prevenir estas complicações, é essencial oferecer aos coelhos domésticos uma dieta que simule as características da alimentação natural, composta por feno e outros alimentos fibrosos. Essa abordagem dietética promove o desgaste essencial dos dentes, reduzindo o

risco de problemas dentários e mantendo o equilíbrio entre crescimento e desgaste (Crossley 2003; Donnelly e Vella 2016).

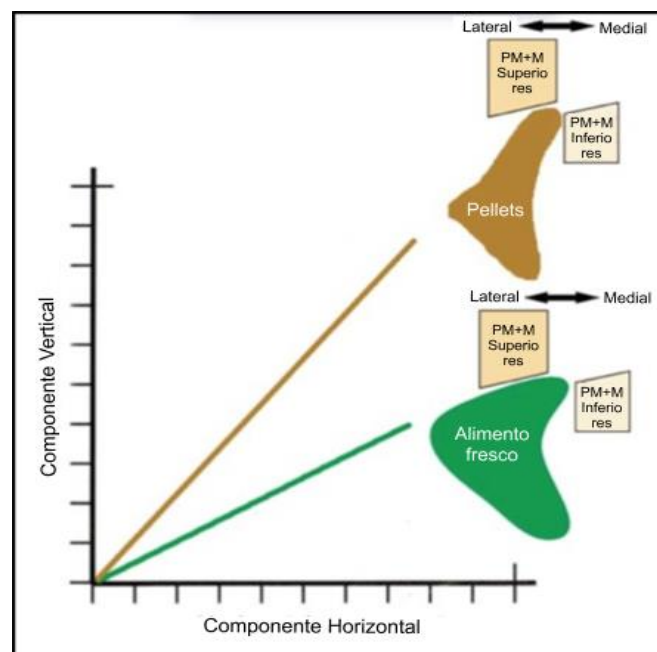


Figura 3. Representação esquemática das componentes verticais e horizontais dos movimentos mastigatórios em função do tipo de alimento ingerido. Alimentos fibrosos, como por exemplo o feno e vegetais frescos, induzem movimentos mastigatórios predominantemente laterais, com menor amplitude vertical. Em contrapartida, alimentos concentrados e granulosos, como as pellets, promovem um padrão de mastigação com maior componente vertical e movimentos laterais mais reduzidos. Adaptado de Capello e Gracis (2005).

O metabolismo do cálcio desempenha um papel fundamental na saúde oral dos coelhos, influenciando diretamente a estabilidade das estruturas dentárias e a prevenção de má oclusão. Nos coelhos, a absorção intestinal de cálcio ocorre predominantemente de forma passiva, diferindo da maioria dos mamíferos, que dependem da vitamina D3 para o transporte ativo do cálcio do lúmen intestinal para o sangue. Esta particularidade permite que os níveis de cálcio plasmático variem amplamente, de acordo com o teor de cálcio presente na dieta (Jekl e Redrobe 2013).

Alguns autores consideram o hiperparatiroidismo nutricional secundário como uma das principais causas da síndrome de doença dentária adquirida progressiva (PSADD) em coelhos (Harcourt-Brown 2006). Alterações radiográficas e morfológicas revelam que a perda de osso alveolar é uma das alterações iniciais observadas nesta condição, comprometendo a fixação dentária e conduzindo à mobilidade dentária. Estas alterações resultam numa deformação progressiva das estruturas dentárias, incluindo o desenvolvimento de espaços interdentários, o que aumenta significativamente o risco de formação de abscessos odontogênicos (Nascimento 2021; Borawski et al. 2024).

Dietas com níveis insuficientes de cálcio ou com desequilíbrios na razão cálcio-fósforo agravam a instabilidade óssea, contribuindo para o desenvolvimento de má oclusão (Jekl e Redrobe 2013). Além disso, a remodelação contínua dos dentes dos coelhos depende de um suporte ósseo estável para manter o alinhamento correto e prevenir complicações estruturais (Harcourt-Brown 2006; Berger 2023).

Para coelhos mantidos em ambientes domésticos, a ausência de exposição à luz natural pode limitar a síntese de vitamina D3, afetando negativamente o metabolismo do cálcio (Jekl e Redrobe 2013). No entanto, mesmo nessas condições, uma dieta rica em cálcio desempenha um papel mais crucial na prevenção de doenças ósseas metabólicas e dentárias (Harcourt-Brown 2006). Assim, um manejo alimentar adequado não só previne problemas dentários, como também contribui para a saúde geral do animal, reduzindo a necessidade de intervenções complexas, como extrações dentárias ou drenagem de abscessos (Harcourt-Brown 2013).

2. Doenças Dentárias em Lagomorfos

2.1. Introdução às Doenças Dentárias em Lagomorfos

As doenças dentárias são processos muito comuns e significativos em animais com dentição elodonte, especialmente em coelhos de estimação, e representam uma grande preocupação tanto para os veterinários como para os tutores (Berger 2023; Jackson et al. 2024). Estes processos podem impactar drasticamente a qualidade de vida dos animais, uma vez que os problemas dentários dificultam a alimentação e podem causar dor crônica e infecções graves (Berger 2023). A prevalência de doenças dentárias em coelhos domésticos é elevada, com estudos a indicar que cerca de 15,36% dos coelhos tratados em clínicas veterinárias apresentam alguma forma de doença dentária, o que sublinha a importância de um manejo preventivo eficaz (Jackson et al. 2024).

Todos os dentes dos coelhos são de crescimento contínuo, o que os torna altamente dependentes de um desgaste constante para evitar o sobrecrescimento e má oclusão (Verstraete e Osofsky 2005; Böhmer 2015). Esse crescimento constante é uma adaptação evolutiva às necessidades alimentares dos coelhos silvestres, que consomem grandes quantidades de fibras abrasivas presentes na vegetação natural (Böhmer e Böhmer 2017).

Para além da dieta, os fatores genéticos e anatómicos desempenham um papel determinante na predisposição dos coelhos para doenças dentárias (Jackson et al. 2024). Coelhos com conformações cranianas específicas, como as raças de orelhas caídas e as braquicefálicas (figura 4), destacam-se pela sua maior predisposição ao desenvolvimento de problemas dentários (Verstraete e Osofsky 2005; Böhmer 2015; Jackson et al. 2024). Esta

vulnerabilidade encontra-se enraizada nas suas predisposições estruturais, onde o posicionamento alterado dos dentes desempenha um papel essencial (Verstraete e Osofsky 2005; Böhmer 2015). Observa-se que essas características anatômicas aumentam a frequência de más oclusões dentárias (Verstraete e Osofsky 2005; Böhmer 2015; Jackson et al. 2024), exigindo cuidados dentários frequentes e específicos, que incluem exames de diagnóstico por imagem, redução de coroa clínica, extrações dentárias e/ou tratamento de abscessos, realizados sob anestesia geral (Harcourt-Brown e Chitty 2013). A conjugação destas particularidades anatômicas com práticas de manejo inadequadas acentua a necessidade de monitorização veterinária frequente, para prevenir o desenvolvimento de condições crônicas (Harcourt-Brown 2007).



Figura 4. Comparação entre crânio de um coelho doliocéfálico (à esquerda) e o crânio de dois coelhos braquicefálicos (ao centro e à direita). Adaptado de Harvey et al. (2019).

A adoção de práticas preventivas, como a oferta de uma dieta rica em feno, é essencial para manter o equilíbrio entre o crescimento e o desgaste dentário (Böhmer 2015). Além disso, é imperativo que os tutores sejam educados sobre as necessidades alimentares específicas dos coelhos, uma vez que uma dieta inadequada constitui um fator de risco significativo para o desenvolvimento de doenças dentárias adquiridas (Edgar e Mullan 2011; Berger 2023).

2.2. Etiologia e Patogénese das Doenças Dentárias

As doenças dentárias em lagomorfos, especialmente em coelhos, resultam de uma complexa interação entre fatores genéticos, dietéticos e ambientais, além de predisposições anatômicas e metabólicas (Berger 2023). Esses fatores influenciam diretamente a capacidade dos coelhos de manter um equilíbrio entre o crescimento e o desgaste dentário, essencial para prevenir alterações como más oclusões, espículas e abscessos dentários (Berger 2023; Jackson et al. 2024).

Alguns coelhos, particularmente raças com conformações cranianas alteradas pela criação seletiva com objetivos estéticos, como as braquicefálicas e de orelhas caídas, apresentam um risco significativamente maior de desenvolver doenças dentárias (Jackson et al. 2024). As alterações no alinhamento dentário e na estrutura craniana observadas nessas

raças estão na origem de uma oclusão não fisiológica, o que compromete o desgaste natural e favorece a ocorrência de doença dentária adquirida. Estudos indicam que estas conformações cranianas não afetam apenas a oclusão dentária, mas também aumentam a frequência necessária de intervenções para o controle da saúde oral (Benato 2017; Jackson et al. 2024).

Para além das alterações de conformação, muitos coelhos de estimação são alimentados com dietas comerciais ou alimentos processados, que não possuem a abrasividade necessária para controlar o crescimento dentário. Como resultado, esses animais desenvolvem más oclusões e espículas dentárias, que causam dor e dificultam a mastigação (Harcourt-Brown 2013; Böhmer 2015).

A saúde dentária dos coelhos está também diretamente relacionada com a qualidade óssea, a qual depende de uma dieta equilibrada em cálcio e vitamina D (Jekl e Redrobe 2013). Como referido anteriormente, o hiperparatiroidismo nutricional secundário, frequentemente causado por níveis insuficientes de cálcio ou desequilíbrios entre cálcio e fósforo na dieta, afeta a resistência e densidade óssea, comprometendo a estabilidade dentária (Harcourt-Brown 2007). Esta alteração metabólica contribui para o desenvolvimento de más oclusões e aumenta o risco de condições dentárias graves, como infeções periapicais e formação de abscessos relacionados a doenças dentárias primárias, as quais podem ser exacerbadas por alterações ósseas causadas por desequilíbrios minerais (Berger 2023).

As doenças dentárias em coelhos progridem, frequentemente, de forma insidiosa, passando de alterações subtis na oclusão para condições mais graves, como abscessos e osteomielite (Verstraete e Osofsky 2005; Vella 2012). O processo geralmente inicia-se com o crescimento descontrolado dos dentes incisivos ou dos molariformes, causado pela ausência de desgaste adequado (Borawski et al. 2024). Esse crescimento excessivo resulta em desalinhamento dentário, que leva à formação de espículas aguçadas que lesam os tecidos moles da cavidade oral, causando dor e inflamação crónica (Böhmer 2015; Berger 2023).

Com o tempo, o sobrecrescimento dentário cria espaços interdentários não fisiológicos, que comprometem a função dos molariformes e favorecem a acumulação de detritos alimentares, pêlos e outros materiais. Este ambiente proporciona condições ideais para a colonização bacteriana, agravada pela dificuldade em manter uma higiene oral adequada (Crossley 2003; Böhmer 2015). Além disso, as características anatómicas dos dentes dos coelhos, como a ausência de raízes anatómicas verdadeiras e a contínua formação de esmalte, aumentam a retenção de resíduos, elevando o risco de infeção (Berger 2023) que, se não for tratada, pode evoluir para abscessos dentários (Benato 2017) (figura 5). Os abscessos contêm, geralmente, uma mistura de bactérias aeróbias e anaeróbias, estando fortemente associados à progressão de doenças dentárias crónicas em coelhos,

especialmente nos casos de doença periodontal ou lesões periapicais. Estas infeções são particularmente difíceis de tratar devido à resistência bacteriana e aos desafios de acesso aos abscessos localizados em estruturas ósseas e dentárias (Harcourt-Brown 2007; Benato 2017), para além da capacidade extraordinária que os coelhos têm de esconder sinais clínicos de doença, o que leva a um diagnóstico destes processos numa fase muito avançada da infeção (Capello 2008).



Figura 5. Imagem original de uma tomografia computadorizada (TC) com reconstrução 3D da cabeça de um coelho doméstico, evidenciando lesões compatíveis com abscessos dentários. Observa-se um abscesso mandibular direito, com envolvimento dos dentes 405 (PM1), 406 (PM2) e 407 (M1), associado a destruição óssea mandibular e formação de massa encapsulada. Na maxila direita, é visível uma área hipodensa compatível correspondente a um abscesso a envolver os dentes 109 (M1) e 110 (M2).

De um modo geral, a etiologia das doenças dentárias em coelhos é multifatorial, envolvendo fatores predisponentes como a ausência de desgaste dentário adequado (Berger 2023). A patogénese reflete a progressão de problemas oclusais e infecciosos, frequentemente culminando em abscessos e condições dolorosas (Lennox 2008b). A compreensão destes fatores é essencial para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas eficazes (Lennox 2008a; Berger 2023).

2.3. Principais Tipos de Doenças Dentárias

2.3.1. Conceitos Gerais

As doenças dentárias são dos problemas de saúde mais comuns e complexos em coelhos, afetando gravemente o seu bem-estar (Jackson et al. 2024). Estas condições são geralmente atribuídas a predisposições anatómicas e alterações de manejo, especialmente dietético, que resultam em crescimento excessivo e desalinhamento dentário. Estas alterações não só dificultam a mastigação, como também causam dor intensa e inflamação (Berger 2023; Jackson et al. 2024) (figura 6).

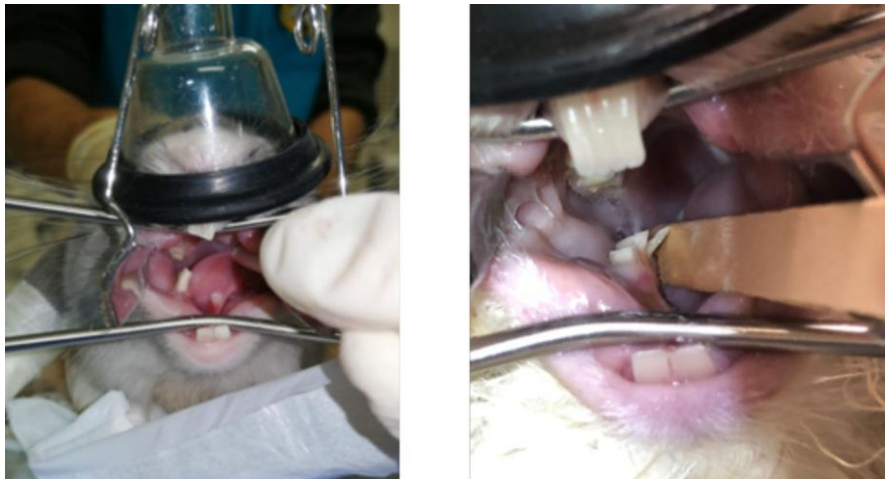


Figura 6. Exemplos de doença dentária em coelhos. À esquerda um coelho com uma úlcera lingual causada por uma espícula e à direita espícula dentária direcionada para a superfície lingual.

A má oclusão dentária caracteriza-se pela incapacidade dos dentes de se alinharem corretamente durante o encerramento da boca, alterando o desgaste natural necessário para equilibrar o crescimento contínuo dos dentes (Verstraete e Osofsky 2005). Dado que os dentes dos coelhos são elodontes, a ausência de desgaste adequado, seja por desalinhamento oclusal ou por uma dieta insuficiente em fibra, provoca um crescimento descontrolado. Consequentemente, os incisivos e molariformes tornam-se anormalmente longos, levando à formação de espículas, que causam dor intensa e inflamação (Böhmer 2015). A dor e a dificuldade em mastigar associadas a estas condições resultam numa ingestão alimentar reduzida, comprometendo o estado nutricional e a saúde geral do animal (Harcourt-Brown 2007).

A doença periodontal manifesta-se em diferentes níveis de gravidade (Crossley 2003). Irregularidades dentárias, como espículas e espaços interdentários anormalmente grandes, interferem na função normal do sistema oclusal, promovendo a acumulação de detritos (Capello 2004; Berger 2023) e a subsequente proliferação bacteriana. Este ambiente propicia o desenvolvimento de gengivite inicial, seguida da perda gradual do ligamento periodontal e destruição do osso alveolar (Crossley 2003). Em estádios mais avançados, formam-se bolsas periodontais que intensificam a acumulação bacteriana; com o agravamento do processo

inflamatório, o ciclo não só persiste como se agrava. Nestes casos, a condição pode evoluir para infecções bacterianas graves, incluindo a formação de abscessos odontogênicos (Crossley 2003). Estes, por sua vez, podem progredir para condições complicadas, como osteomielite (Harcourt Brown 2013), as quais comprometem ainda mais a saúde oral (Capello 2008). A mobilidade dentária pode resultar da perda de osso periapical, infecção ou fratura da coroa. Nos casos de PSADD, a perda de esmalte e o enfraquecimento do dente proporcionam fraturas abaixo do nível do osso alveolar, onde o dente deixa de ser suportado (Meredith & Lord, 2014). O estágio final desta progressão caracteriza-se pela perda da coroa clínica e pelo crescimento de tecido gengival sobre o osso exposto, numa tentativa de o proteger (Crossley 2003).

Em suma, as doenças dentárias em coelhos são condições multifatoriais e progressivas que se agravam ao longo do tempo na ausência de um manejo adequado (Berger 2023). As más oclusões, as espículas dentárias e doença periodontal são condições que interagem frequentemente entre si, resultando num ciclo contínuo de lesões, inflamação e infecção (Harcourt-Brown 2009), que impactam gravemente a qualidade de vida dos coelhos de estimação (Lennox 2008a). A compreensão das condições dentárias e dos seus fatores causais é essencial para formular estratégias eficazes de prevenção e tratamento em coelhos, ao abordar as causas subjacentes e promover melhores resultados clínicos (Jekl e Redrobe 2013).

2.3.2. Abscessos Dentários

Os abscessos dentários em coelhos são uma das complicações mais graves da doença dentária adquirida e ocorrem como resultado de infecções bacterianas crônicas associadas ao crescimento descontrolado e má oclusão dentária (Benato 2017). Estas infecções estão, por vezes, relacionadas com fatores como inflamações persistentes e lesões dos tecidos moles, frequentemente provocadas pela presença de espículas dentárias (Harcourt-Brown 2007). Os abscessos odontogênicos representam um grande desafio clínico devido à sua tendência para a recorrência, resistência bacteriana e complexidade do tratamento necessário (Benato 2017).

2.3.2.1. Formação e Desenvolvimento

A formação dos abscessos dentários em coelhos inicia-se com lesões nos tecidos orais causadas por espículas ou más oclusões (Benato 2017; Berger, 2023). Essas lesões, quando não tratadas, levam a uma inflamação persistente, criando condições favoráveis à colonização bacteriana (Berger 2023). Os abscessos odontogênicos são frequentemente compostos por uma mistura de bactérias aeróbias e anaeróbias. Vários estudos analisaram os géneros

bacterianos associados a abscessos odontogénicos em coelhos, identificando diferenças e semelhanças nos seus achados. Gardhouse et al. (2017) destacaram os géneros anaeróbios *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* e *Bacteroides*, bem como os géneros aeróbios *Pseudomonas*, *Pasteurella*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*. Já o estudo de Tyrrell et al. (2002) relatou a presença dos géneros anaeróbios *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Actinomyces* e *Arcanobacterium*, e dos géneros aeróbios *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neisseria* e *Achromobacter*. A comparação entre os dois estudos revelou géneros comuns, nomeadamente *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*. Contudo, observaram-se diferenças entre os dois trabalhos noutros géneros bacterianos identificados.

A generalidade das bactérias presentes nos abscessos prolifera em áreas onde o tecido está danificado e suscetível a infeções (Verstraete e Osofsky 2005). O caráter inflamatório crónico, associado à acumulação de pus envolvido por uma cápsula fibrosa, limita a eficácia dos antibióticos e de outras abordagens terapêuticas convencionais, o que torna os abscessos odontogénicos particularmente difíceis de tratar (Harcourt-Brown 2006; Benato 2017).

A formação de uma cápsula fibrosa em torno do abscesso pode impedir que a drenagem espontânea resultante da rutura do abscesso seja eficaz, característica que distingue os abscessos dentários em coelhos dos observados em outras espécies animais (Benato 2017). Adicionalmente, a cápsula cria um ambiente favorável à multiplicação das bactérias anaeróbias, dificultando o tratamento devido à baixa vascularização da cápsula e à natureza espessa e caseosa do pus (Tyrrell et al. 2002). A invasão bacteriana dos tecidos ósseos adjacentes pode conduzir a osteomielite, infeção óssea que agrava substancialmente o quadro clínico e que, frequentemente, requer intervenções cirúrgicas invasivas para assegurar a completa erradicação dos tecidos infetados (Böhmer 2015).

2.3.2.2. Complicações e Impacto na Saúde

Os abscessos dentários em coelhos podem exercer um impacto devastador na saúde geral do animal (Bohmer 2015). A localização próxima do tecido ósseo, aliada à ineficácia da drenagem espontânea, favorece a expansão dos abscessos para estruturas adjacentes, resultando em dor intensa e dificuldades na alimentação, o que compromete significativamente a qualidade de vida do coelho (Taylor et al. 2010). A progressão destas lesões pode culminar em infeções sistémicas, particularmente nos casos em que ocorre osteomielite, uma condição extremamente dolorosa e frequentemente irreversível (Capello 2008). A doença dentária associada aos abscessos crónicos pode também resultar em anorexia e perda de peso, prejudicando a capacidade do animal para manter uma condição corporal saudável (Harcourt-Brown 2007).

A presença de osteomielite associada ao abscesso odontogénico aumenta a complexidade do tratamento, uma vez que exige a remoção cirúrgica do tecido ósseo infetado, para evitar a recorrência da infeção (Capello 2008). Neste contexto, na ausência de uma intervenção cirúrgica adequada, a antibioterapia isolada não se revela eficaz para o controlo destes processos (Taylor et al. 2010).

2.3.2.3. Diagnóstico e Sintomas Clínicos

O diagnóstico de abscessos dentários em coelhos apresenta elevada complexidade, requerendo a integração do exame clínico com métodos avançados de imagem (Capello 2008). Clinicamente, os sinais associados incluem tumefação facial, dor, anorexia e, em casos de fistulização, drenagem de pus para o exterior (Taylor et al. 2010; Levy e Mans 2024). Contudo, a avaliação visual isolada revela-se insuficiente para determinar a extensão real do abscesso, especialmente em situações de envolvimento ósseo (Böhmer 2015). Para uma avaliação precisa, é indispensável a realização de exames de imagem, como radiografias e tomografias computadorizadas (TC). Estes métodos permitem avaliar a profundidade e a extensão do abscesso, além de identificar possíveis casos de osteomielite, fornecendo informações fundamentais para a definição do plano terapêutico mais adequado (Böhmer 2015; Levy e Mans 2024).

As radiografias são particularmente úteis para detetar alterações ósseas e localizar o abscesso, embora a sua capacidade de diagnóstico seja inferior à da tomografia computadorizada (Levy e Mans 2024). A TC, por sua vez, oferece imagens tridimensionais, facilitando a avaliação das estruturas ósseas e dos tecidos moles envolvidos, bem como a identificação de complicações, como osteomielite. Um diagnóstico precoce e detalhado é imprescindível para o sucesso terapêutico, uma vez que abscessos em estádios avançados frequentemente exigem intervenções cirúrgicas extensas e prolongadas para a completa erradicação da infeção (Borawski et al. 2024; Levy e Mans 2024).

2.4. Abordagens Terapêuticas e Maneio

O maneio e o tratamento das doenças dentárias em coelhos exigem uma combinação cuidadosa de estratégias preventivas e intervenções clínicas, dada a complexidade e a natureza frequentemente crónica destas condições (Lennox 2008a; Berger 2023). As abordagens terapêuticas incluem tanto medidas preventivas, orientadas para minimizar a incidência de problemas dentários (Harcourt-Brown 2007), como também tratamentos específicos direcionados a processos patológicos mais graves, como os abscessos

odontogénicos, que figuram entre os maiores desafios na prática clínica aplicada à medicina de coelhos (Capello 2008).

2.4.1. Tratamento da Doença Dentária em Coelhos

O tratamento da doença dentária adquirida em coelhos exige uma abordagem multidisciplinar, na qual os ajustes dentários periódicos desempenham um papel central (Harcourt-Brown 2007). Estes procedimentos, realizados com instrumentos especializados, são indispensáveis para corrigir más oclusões e eliminar espículas dentárias, que causam dor e lesões na mucosa oral. Assim, garante-se que o comprimento dentário se mantém dentro de limites fisiológicos, reduzindo significativamente o risco de complicações associadas (Capello 2006). Paralelamente, o suporte nutricional adequado é uma componente crítica desta abordagem terapêutica. Dietas ricas em fibra, concebidas para simular os hábitos alimentares naturais dos coelhos, promovem o desgaste contínuo e uniforme dos dentes, prevenindo o crescimento excessivo e o desenvolvimento de novas irregularidades (Böhmer 2015). No entanto, muitos coelhos com doença dentária adquirida desenvolvem alterações tão marcadas que mesmo após intervenção adequada são incapazes de comer alimentos com elevado conteúdo fibroso, como é o caso do feno (Harcourt-Brown e Chitty 2013). Neste sentido, o tratamento da doença dentária não se limita às intervenções físicas e nutricionais. O controlo eficaz da dor, sobretudo em casos de lesões ou no período pós-procedimento, é indispensável. Analgésicos adequados, administrados de forma controlada, aliviam o sofrimento e favorecem a recuperação. Em simultâneo, em situações onde infeções bacterianas estejam presentes, o uso criterioso de antibióticos torna-se necessário para controlar a disseminação da infeção e restaurar a saúde oral (Capello 2006; Böhmer 2015). Este maneio integrado é essencial para melhorar a qualidade de vida dos coelhos afetados, permitindo minimizar os impactos negativos da doença dentária e das suas complicações (Böhmer 2015).

2.4.2. Abordagem Clínica aos Abscessos Odontogénicos

O tratamento dos abscessos dentários em coelhos é uma tarefa complexa e requer uma abordagem multidisciplinar, envolvendo técnicas cirúrgicas, terapias antimicrobianas e extrações dentárias (Capello 2008; Gardhouse 2017). Devido à natureza encapsulada dos abscessos odontogénicos em coelhos, a drenagem espontânea é incomum e ineficaz, o que torna a intervenção cirúrgica quase invariavelmente necessária (Levy e Mans 2024). Durante a cirurgia, o abscesso é cuidadosamente aberto para drenagem do conteúdo purulento, o que reduz a carga bacteriana e o desconforto do animal (Capello 2008; Böhmer 2015). Sempre

que viável, procede-se à remoção da cápsula fibrosa, uma estratégia que minimiza o risco de recorrência. Contudo, em muitos casos, devido à localização ou à extensão do abscesso, a remoção completa da cápsula pode revelar-se impraticável. Nestes casos, recorre-se frequentemente a técnicas alternativas, das quais a marsupialização é a mais comumente recomendada (Capello 2008). Este procedimento consiste na criação de uma abertura permanente na cápsula do abscesso, permitindo a drenagem contínua e facilitando a administração tópica de agentes antimicrobianos. Esta técnica tem demonstrado eficácia na gestão de infeções, promovendo o controlo microbiano e acelerando o processo de cicatrização, sendo particularmente útil em abscessos crónicos ou de difícil acesso. Apesar dos seus benefícios, este procedimento apresenta desafios significativos, uma vez que a cápsula do abscesso é frequentemente espessa e resistente, o que limita a penetração dos antibióticos e exige precisão cirúrgica para garantir uma excisão adequada. Também requer um maneio pós-cirúrgico prolongado e trabalhoso, exigindo um investimento económico considerável e uma elevada dedicação por parte dos tutores. A combinação destes fatores sublinha a necessidade de um planeamento cuidadoso e de uma execução técnica rigorosa para otimizar os resultados terapêuticos (Capello 2008; Böhmer 2015).

A terapia antimicrobiana constitui um elemento fundamental no tratamento dos abscessos odontogénicos em coelhos. Geralmente, recorre-se a antibióticos de amplo espectro com boa capacidade de penetração óssea para combater eficazmente as bactérias envolvidas na infeção, dada a natureza polimicrobiana destes abscessos. Estes são frequentemente compostos por bactérias aeróbias, como *Streptococcus* e *Staphylococcus*, e anaeróbias, como *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium* (Benato 2017). A seleção do antibiótico ideal deve ser guiada, sempre que possível, por culturas bacterianas e testes de sensibilidade (Capello 2008). Este procedimento é crucial, não apenas para identificar as espécies bacterianas específicas, mas também para determinar a sua sensibilidade aos diferentes antibióticos disponíveis, garantindo a eficácia terapêutica e reduzindo o risco de resistência antimicrobiana (Gardhouse et al. 2017). A duração da terapia antibiótica em coelhos com abscessos odontogénicos tende a ser prolongada, podendo variar entre 14 e 180 dias, dependendo da gravidade do quadro clínico e dos resultados das culturas bacterianas. A monitorização contínua da resposta ao tratamento, por meio de análises bacteriológicas e testes de sensibilidade, é indispensável para ajustar o protocolo terapêutico de forma adequada (Capello 2008; Benato 2017). Apesar da sua importância, o uso de antibióticos em coelhos apresenta limitações significativas (Capello 2008). Diversas classes de antibióticos, como β -lactâmicos e eritromicina, são contraindicadas devido ao risco elevado de enterite grave e disbiose (Carpenter e Harms 2023). Além disso, aminoglicosídeos, como gentamicina e amicacina, podem ser nefrotóxicos e devem ser usados com precaução (Benato 2017). Por

estas razões, a escolha do antibiótico deve ser sempre baseada em dados obtidos de culturas bacterianas e antibiogramas, assegurando a eficácia do tratamento, reduzindo o impacto sobre a saúde gastrointestinal do animal e minimizando o desenvolvimento de resistência antimicrobiana (Schwab et al. 2024).

Nos casos em que o abscesso está associado a osteomielite, a intervenção cirúrgica exige a remoção das áreas de osso afetado, para evitar a recorrência da infecção. Esse procedimento é invasivo e requer competências técnicas específicas, uma vez que a remoção óssea parcial ou completa deve ser realizada com precisão para minimizar o risco de recidiva da infecção. Adicionalmente, existe o risco de fratura iatrogénica da mandíbula, uma complicação grave que pode comprometer significativamente a recuperação do animal e requer consideração especial durante o planeamento e a execução do procedimento cirúrgico (Capello 2008). A dor pós-operatória nesses casos é intensa, e o controlo da dor envolve o uso de analgésicos potentes, como opioides e anti-inflamatórios não esteróides, bem como fármacos adjuvantes do manejo da dor, para garantir o conforto do animal durante o processo de recuperação (Böhmer 2015).

2.4.3. Maneio Pós-tratamento e Acompanhamento

O acompanhamento rigoroso de coelhos após o tratamento de abscessos dentários é imprescindível para garantir uma recuperação eficaz e minimizar a probabilidade de recorrência da doença (Taylor et al. 2010). A anatomia complexa desses animais, caracterizada por estruturas dentárias e ósseas complexas, apresenta desafios significativos para o manejo clínico, tornando indispensáveis consultas regulares para monitorização e deteção precoce de novas infeções ou alterações dentárias (Capello 2008).

No período pós-operatório imediato, o tratamento de suporte desempenha um papel crucial na recuperação. A alimentação assistida, por exemplo, é frequentemente necessária para evitar a anorexia e a consequente perda de peso, problemas comuns em coelhos submetidos a procedimentos invasivos. Além disso, a limpeza meticulosa da ferida cirúrgica, particularmente em casos de marsupialização, também é fundamental para o controlo da infeção e reduz consideravelmente o risco de infeções secundárias (Capello 2008; Harcourt-Brown e Chitty 2013). No entanto, este processo exige mais do que apenas cuidados veterinários: a dedicação contínua do tutor é igualmente essencial. A manutenção de uma rotina de higiene, o fornecimento de uma dieta adequada e o cumprimento de recomendações específicas podem prolongar-se por semanas ou até meses, acarretando custos consideráveis que nem sempre são esperados pelos tutores (Capello 2008). Adicionalmente, para assegurar um acompanhamento abrangente, exames de imagem – como radiografias ou tomografias computadorizadas – são altamente recomendados. Estes permitem avaliar

com precisão o estado dos ossos adjacentes à área afetada, possibilitando a identificação precoce de complicações graves, como a osteomielite, antes mesmo que sinais clínicos evidentes se manifestem (Taylor et al. 2010).

Após os tratamentos dentários, a dieta dos coelhos deve ser ajustada para incluir altos níveis de fibra, como feno, para minimizar o risco de desgaste inadequado e garantir um desgaste dentário equilibrado e natural (Böhmer 2015). No entanto, a realidade clínica revela um cenário desafiador: coelhos que sofrem de doença dentária adquirida frequentemente exibem alterações morfológicas graves nos dentes, o que compromete, de forma marcada, a sua capacidade de consumir feno adequadamente (Berger 2023). Este fator perpetua um círculo vicioso, onde a incapacidade de ingerir fibras é exacerbada pelas limitações dentárias, dificultando ainda mais o manejo a longo prazo e agravando o estado de saúde geral do animal (Böhmer 2015).

Adicionalmente, a consciencialização dos tutores sobre os cuidados preventivos é uma ferramenta indispensável na luta contra as complicações dentárias recorrentes. Muitos proprietários, devido à falta de conhecimento sobre as exigências alimentares específicas dos coelhos, ignoram a importância de uma dieta rica em fibra como pilar essencial para a saúde oral (Berger, 2023; Jackson et al. 2024). Além disso, é comum subestimarem o impacto das consultas veterinárias regulares, fundamentais para identificar precocemente problemas dentários (Berger 2023). Medidas preventivas bem implementadas não apenas reduzem a incidência de complicações dentárias graves, mas também promovem um bem-estar duradouro e uma melhor qualidade de vida para os coelhos (O'Neill et al. 2019).

3. Microbiota e Microbioma Oral

3.1. Definição e Importância da Microbiota Oral

A microbiota oral corresponde ao conjunto de microrganismos que habitam a cavidade oral (Gao et al. 2018). Esta comunidade é composta por um vasto espectro de bactérias, protozoários, Archaea, vírus e fungos, formando o segundo maior ecossistema microbiano do corpo humano depois da comunidade microbiana presente no intestino (Deo e Deshmukh 2019). O conjunto destes microrganismos, a sua informação genética, e o ambiente em que eles interagem designa-se por microbioma oral (Kilian et al. 2016).

A microbiota oral desempenha um papel crucial na preservação da saúde oral e do equilíbrio do organismo como um todo. Na cavidade oral humana já foram identificadas mais de 700 espécies bacterianas (Deo e Deshmukh, 2019), sendo que, por indivíduo, coabitam em média 296 espécies (Kilian et al. 2016). No cão foi já identificado um total de 353 grupos taxonómicos (Dewhirst et al. 2012) e no gato um total de 171 grupos (Dewhirst et al. 2015). A

estrutura anatômica diversificada da cavidade oral proporciona uma variedade de nichos ecológicos para a colonização microbiana, incluindo superfícies firmes, como os dentes, e superfícies moles, como a mucosa (Zaura et al. 2009; Dewhirst et al. 2010). Além dos dentes, outras partes da boca, como a língua, o palato duro e mole, e as tonsilas, apresentam características específicas que favorecem a formação de micro-habitats, permitindo que diferentes espécies microbianas colonizem estes ambientes de acordo com as condições particulares de cada superfície (Aas et al. 2005; Avila et al. 2009). Estudos demonstram que até mesmo regiões próximas, como as diferentes partes da língua e do palato, apresentam perfis bacterianos distintos, ressaltando a complexidade e a riqueza desse ecossistema (Aas et al. 2005).

A adesão de microrganismos a superfícies ocorre através de moléculas denominadas adesinas, que interagem com recetores complementares presentes nas estruturas da cavidade oral, favorecendo a colonização de determinados locais por microrganismos específicos (Kolenbrander e London 1993). Assim, a distribuição de espécies na cavidade oral não é aleatória, mas sim orientada por fatores como a estrutura e a função dos tecidos. Essa colonização altamente seletiva é fundamental para que a microbiota oral se adapte continuamente às mudanças constantes do ambiente, como as variações no pH, o potencial redox, a salinidade e as características da saliva, que refletem fatores como dieta, idade, saúde geral e práticas de higiene oral (Parahitiyawa et al. 2010; Badger et al. 2011).

Além de atuar como uma defesa natural contra a invasão de agentes patogênicos, a microbiota oral contribui significativamente para a homeostase oral e sistêmica. Nos animais saudáveis, as comunidades microbianas mantêm relações de comensalismo e mutualismo com o hospedeiro, o que implica um equilíbrio ecológico que favorece a coexistência de microrganismos benéficos, essenciais para o funcionamento do sistema imunitário e a prevenção de infecções (Ruby e Goldner 2007; Filoche et al. 2010). Esta biodiversidade é considerada crucial para a manutenção da saúde oral, uma vez que previne o estabelecimento e a proliferação de microrganismos patogênicos ao ocupar nichos específicos, competindo por recursos e inibindo ativamente a colonização e a multiplicação de microrganismos causadores de doenças (Socransky e Haffajee 1992; Zarco et al. 2012).

A relação simbiótica entre o hospedeiro e a microbiota oral vai além da saúde oral, abrangendo efeitos sistêmicos. Os microrganismos orais contribuem não só para a digestão de alimentos, mas também auxiliam na produção de energia e participam na diferenciação e maturação da mucosa e no desenvolvimento do sistema imunitário (Kilian et al. 2016). A relação entre a microbiota e o hospedeiro forma um "supra-organismo", onde o genoma dos microrganismos - o metagenoma - atua como uma extensão genética do próprio organismo humano, aumentando a diversidade de genes e conferindo capacidades adicionais que não

evoluíram com o próprio hospedeiro (Turnbaugh et al. 2007; Rajendhran e Gunasekaran 2010).

Contudo, o equilíbrio da microbiota oral pode ser comprometido por diversos fatores, levando a um fenômeno conhecido como disbiose. Neste caso, microrganismos anteriormente comensais podem tornar-se patogênicos e proliferar, favorecendo o desenvolvimento de doenças orais, como cáries e periodontite (Parahitiyawa et al. 2010). Em situações de disbiose, as interações mutualísticas e de comensalismo entre microrganismos são alteradas, permitindo que espécies patogênicas oportunistas assumam um papel dominante, perturbando a homeostase e aumentando a suscetibilidade do hospedeiro a infecções (Nieuw Amerongen e Veerman 2002; Avila et al. 2009). Uma multiplicação descontrolada desses microrganismos enfraquece a ação protetora das espécies benéficas e cria um ambiente favorável ao desenvolvimento de condições inflamatórias e infecciosas (Ruby e Goldner 2007).

Uma vez que a microbiota oral é uma comunidade microbiana diversificada e ecologicamente complexa, que desempenha papéis cruciais para a saúde bucal e para o bem-estar geral do hospedeiro, a compreensão da estrutura, função e interações dessa comunidade microbiana é fundamental, não apenas para a prevenção e o tratamento de doenças orais, mas também para promover um equilíbrio microbiano benéfico que sustente a saúde do hospedeiro a longo prazo (Kilian et al. 2016).

3.2. Composição do Microbiota Oral em Mamíferos

A composição da microbiota oral em mamíferos exibe uma complexidade adaptativa notável, que varia conforme a espécie animal, as características anatômicas da cavidade oral e o ambiente ecológico do hospedeiro (Aas et al. 2005; Zaura et al. 2009; Deo e Deshmukh 2019; Flenghi et al. 2023).

Em humanos, diversos estudos sugerem que a microbiota oral saudável possui uma composição específica, onde determinados gêneros bacterianos predominam, contribuindo para um ecossistema equilibrado. Em cavidades orais saudáveis, os gêneros mais representativos incluem *Streptococcus*, *Veillonella*, *Granulicatella*, *Gamella*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Treponema*, *Lactobacterium*, *Eikenella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, *Eubacteria* e *Propionibacterium* (Aas et al. 2005; Jenkinson e Lamont 2005; Zaura et al. 2009; Bik et al. 2010). Esse perfil microbiano é importante, onde a interação entre estes gêneros ajuda a manter a homeostase oral e previne a proliferação de microrganismos patogênicos (Socransky e Haffajee 1992; Ruby e Goldner 2007; Zaura et al. 2009; Zarco et al. 2012).

A microbiota bacteriana humana saudável contrasta significativamente com a presente em casos de doença, sugerindo que existe um *core* microbiano associado à saúde oral (Aas et al. 2005; Jenkinson e Lamont 2005; Zaura et al. 2009). Por exemplo, na presença de abscessos apicais humanos, há um aumento na predominância de microrganismos anaeróbios como *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Dialister* e *Treponema*, além de *Streptococcus*, que é anaeróbio facultativo. Esses gêneros possuem alta capacidade de sobreviver em ambientes de baixa concentração em oxigênio, o que facilita a sua proliferação em infecções profundas (Siqueira e Rôças 2013). Esses dados sugerem que a saúde oral humana depende não apenas da presença de certos microrganismos comensais, mas também da capacidade de controlar a proliferação de microrganismos potencialmente patogênicos na cavidade oral (Socransky e Haffajee 1992; Ruby e Goldner 2007; Filoche et al. 2010).

Embora a microbiota oral dos coelhos apresente alguns gêneros bacterianos em comum com a dos humanos, a sua composição global é distinta, sendo reflexo das necessidades ecológicas e dietéticas específicas dos lagomorfos (Tyrrell et al. 2002; Velasco-Galilea et al. 2018; Flenghi et al. 2023). Estudos referem que as bactérias mais comumente isoladas a partir da cavidade oral de coelhos saudáveis incluem as pertencentes aos gêneros *Streptococcus*, *Rothia*, *Enterobacter*, *Staphylococcus* e *Actinomyces*, que em conjunto representam mais de metade das espécies bacterianas presentes nestes ambientes. Esses gêneros pertencem principalmente aos filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes, revelando uma composição bacteriana adaptada a uma dieta rica em fibras e às características da cavidade oral desses animais, que inclui superfícies duras e moles que facilitam a colonização bacteriana (Flenghi et al. 2023).

No caso de abscessos orais em coelhos, os gêneros mais frequentemente isolados incluem *Staphylococcus* spp. (21,7%), *Pasteurella* spp. (13,3%) e *Pseudomonas* spp. (11,6%), que estão associados a infecções e inflamações na cavidade oral (Schwab et al. 2024). Outras espécies bacterianas, tais como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius* e *Actinomyces israelii*, também estão presentes em abscessos odontogênicos, observando-se uma combinação de bactérias aeróbias e anaeróbias em infecções profundas (Tyrrell et al. 2002; Gardhouse et al. 2017).

As diferenças entre a composição da microbiota oral de indivíduos saudáveis e afetados por doenças demonstram a complexidade e importância de uma microbiota equilibrada. No caso dos coelhos, embora a presença de gêneros como *Streptococcus* e *Actinomyces* seja comum em indivíduos saudáveis, esses mesmos microrganismos podem tornar-se oportunistas e patogênicos em casos de disbiose, especialmente na presença de abscessos dentários (Tyrrell et al. 2002; Taylor et al. 2010; Gardhouse et al. 2017).

Assim, a composição da microbiota oral de mamíferos, sejam humanos ou coelhos, reflete a especificidade do hospedeiro e a adaptabilidade dos microrganismos aos microambientes da cavidade oral (Aas et al. 2005; Deo e Deshmukh 2019; Flenghi et al. 2023). Enquanto a microbiota oral humana é caracterizada por um *core* microbiano relativamente estável tanto em indivíduos saudáveis como doentes, nos coelhos, o ecossistema oral apresenta uma notável flexibilidade, possivelmente devido a fatores como a dieta e a fisiologia destes animais, o que também contribui para serem considerados como um bom modelo animal para o estudo de doenças dentárias em mamíferos (Tyrrell et al. 2002; Gardhouse et al. 2017; Velasco-Galilea et al. 2018).

3.3. Fatores que Influenciam a Microbiota Oral

A microbiota oral é moldada por uma variedade de fatores que influenciam a sua composição e dinâmica. A cavidade oral humana desempenha um papel relevante em várias funções essenciais, incluindo alimentação, comunicação e defesa contra infecções, que por sua vez influenciam diretamente a multiplicação e a atividade bacteriana. Adicionalmente, o ecossistema oral é impactado por práticas de higiene oral, que alteram a comunidade microbiana. Outros fatores como dieta, idade e saúde também influenciam a microbiota oral, assim como variações no pH, potencial redox, condições atmosféricas, salinidade e a fração aquosa da saliva (Parahitiyawa et al. 2010; Badger et al. 2011).

Nos seres humanos, a microbiota oral é dividida em *core microbiota*, comum a todos os indivíduos, e fração variável, característica do indivíduo, que evolui em resposta a fatores como estilo de vida e influências externas (Zarco et al., 2012; Deo e Deshmukh, 2019). A ocorrência destas duas frações sublinha a influência de fatores externos e individuais sobre o ecossistema oral, sendo que condições como o ambiente social também podem ser relevantes em algumas espécies. Em coelhos, por exemplo, estudos mostram que animais que vivem juntos e compartilham atividades sociais, como o “grooming” e a lambadura, podem apresentar uma microbiota oral diferente em função dessa interação (Flenghi et al. 2023).

Além disso, a microbiota oral é um ecossistema dinâmico, sujeito a mudanças temporais e espaciais que variam ao longo do desenvolvimento do hospedeiro e como resultado de vários fatores, incluindo a variação na dieta, a frequência de exposição a novos microambientes e a resposta a mudanças no pH da cavidade oral. Ao longo do tempo, mutações genéticas e transferência horizontal de genes também permitem que as espécies bacterianas adquiram novas características, contribuindo para a diversidade e adaptabilidade da microbiota oral (McLean 2014).

Além disso, o tratamento com antibióticos pode dificultar o isolamento de certas bactérias, incluindo de microrganismos patogênicos. Em coelhos, isso é particularmente

crítico na detecção de bactérias associadas a abscessos, onde o uso de antibióticos pode inativar as bactérias, dificultando o seu isolamento e o diagnóstico da doença (Benato 2017). A adoção de técnicas apropriadas de amostragem e isolamento, que permitam a detecção de bactérias aeróbias e anaeróbias, é essencial para evitar resultados falso-negativos, uma vez que microrganismos anaeróbios estão frequentemente envolvidos na patogênese dos abscessos em coelhos (Capello 2016; Benato 2017).

As interações microbianas e as respostas do hospedeiro desempenham papéis críticos na manutenção da homeostase oral e na prevenção de doenças (Socransky e Haffajee 1992; Ruby e Goldner 2007). A atividade da microbiota contribui para funções fisiológicas, metabólicas e imunológicas que são fundamentais para a saúde oral e sistêmica (Kilian et al. 2016). Esse equilíbrio tem influência em diversas funções, como na digestão, produção de energia, desenvolvimento imunológico e manutenção da barreira das mucosas, bem como na prevenção da colonização da cavidade oral por agentes patogênicos (Kilian et al. 2016). Esta influência reflete a importância de uma microbiota oral adaptável e resiliente, que responda tanto a condições naturais como a intervenções externas no sentido da manutenção da saúde do hospedeiro (Zarco et al. 2012; McLean 2014).

4. Técnicas de Sequenciação para Estudo do Microbioma

4.1. Introdução às Técnicas de Sequenciação para Estudo do Microbioma

A sequenciação revolucionou a microbiologia ao permitir uma visão aprofundada das comunidades microbianas que incluam microrganismos difíceis ou impossíveis de cultivar. Em ambientes complexos como a cavidade oral, esta tecnologia possibilita identificar uma ampla variedade de espécies diferentes, e conseqüentemente estudar as suas funções e interações entre si e com o meio envolvente (Hu et al. 2021; Vecere et al. 2022). Com o desenvolvimento de tecnologias avançadas de sequenciação, a metagenômica emergiu como uma abordagem essencial, permitindo uma análise detalhada e mais precisa de amostras complexas. Esse método dispensa a realização de culturas bacterianas, favorecendo a análise precisa de comunidades microbianas nas suas condições naturais (Cunha et al. 2021; Wang et al. 2021).

4.2. Evolução das Técnicas de Sequenciação de DNA e sua Aplicação na análise do Microbioma

As técnicas de sequenciação de DNA apresentaram uma grande evolução, desde o método de Sanger, o qual, embora pioneiro, apresentava limitações significativas em termos de custo e tempo necessários para sequenciar regiões de DNA de tamanho elevado. Este

método, baseado na incorporação de nucleotídeos modificados para interromper a replicação, era preciso, mas restrito a leituras curtas e a análises de pequena escala, tornando-se inviável para projetos maiores e caracterização de microbiomas (Goodwin et al. 2016).

Com o desenvolvimento da *Next Generation Sequencing* (NGS) na década de 2000, a capacidade de gerar dados de sequenciação aumentou exponencialmente, viabilizando projetos de larga escala a um custo significativamente reduzido. Esta tecnologia de 2ª geração permitiu sequenciar simultaneamente milhões de fragmentos de DNA, o que revolucionou a análise de microbiomas ao permitir uma caracterização mais abrangente das comunidades microbianas em diferentes ambientes e contextos de saúde. Este avanço tecnológico possibilitou a identificação de muitas espécies microbianas anteriormente desconhecidas, destacando-se como uma ferramenta essencial para a análise metagenômica e a investigação das interações microbianas em amostras complexas (Goodwin et al. 2016).

No entanto, apesar de suas vantagens, a NGS apresenta limitações relativamente à análise de regiões repetitivas e à montagem de genomas completos devido à realização de leituras curtas, que geralmente requerem a fragmentação do DNA antes da sequenciação. Este processo pode dificultar a identificação de variantes estruturais e a resolução de regiões complexas, especialmente em genomas microbianos com alta homologia entre espécies, o que compromete a precisão taxonômica em estudos de metagenômica (Goodwin et al. 2016; Oxford Nanopore Technologies 2020a).

Para superar estas limitações, foram desenvolvidas tecnologias de sequenciação de terceira geração, que, ao possibilitar a resolução de *long reads*, permitiram alcançar um nível de detalhe anteriormente inacessível. Plataformas como PacBio® e Oxford Nanopore® permitem a leitura de fragmentos de DNA muito mais extensos, o que facilita a montagem de genomas completos e a análise de regiões estruturais complexas, tornando-se especialmente úteis para estudos de microbiomas (Goodwin et al. 2016; Wang et al. 2021). A abordagem de *long-read sequencing* é particularmente útil para a identificação de microrganismos em comunidades com alta diversidade, como o microbioma oral, onde a distinção precisa entre espécies semelhantes é essencial para uma compreensão detalhada da dinâmica microbiana (Oxford Nanopore Technologies 2019; Hu et al. 2021).

Além disso, estas plataformas apresentam a capacidade de sequenciar genomas de maneira mais eficiente e rápida, o que é crucial para estudos que requerem uma resposta em tempo real ou a análise imediata de amostras de campo. A portabilidade e a possibilidade de realização de técnicas de sequenciação em ambientes fora do laboratório, através da utilização de dispositivos portáteis da Oxford Nanopore®, facilitam o estudo de microbiomas em locais remotos, reduzindo o tempo entre a colheita das amostras e a obtenção de resultados (Goodwin et al. 2016; Oxford Nanopore Technologies 2020).

Este avanço na história da sequenciação, com a transição das tecnologias de leitura curta para longa, permitiu uma expansão no campo da microbiologia e na compreensão de microbiomas complexos. Tecnologias como a Oxford Nanopore® permitem maior precisão e acessibilidade no estudo de microbiomas, representando uma ferramenta robusta para a exploração da diversidade microbiana e da sua relação com o hospedeiro em condições de saúde e doença (Wang et al. 2021; Oxford Nanopore Technologies 2019).

4.3. Sequenciação de Terceira Geração e Long-read Sequencing

O sistema Oxford Nanopore® utiliza uma proteína em forma de poro, que se encontra inserida numa membrana polimérica eletricamente resistente, e funciona como um biossensor. Quando uma voltagem constante é aplicada, moléculas de DNA ou RNA, que possuem carga negativa, são impulsionadas da face negativa (cis) para a face positiva (trans). A translocação é controlada por uma proteína motora que impulsiona a molécula, regulando a sua velocidade e garantindo que apenas uma cadeia simples de DNA ou RNA passa pelo nanoporo (Wang et al. 2021). À medida que a molécula o atravessa, a sequência de nucleótidos modula a corrente elétrica de forma característica, permitindo que um software interprete os dados e reconstrua a sequência do material genético em tempo real. (Goodwin et al. 2016; Wang et al. 2021). Esta característica reduz o enviesamento das reações de sequenciação e preserva a integridade das amostras, tornando-se um recurso valioso em análises que exigem uma representação fiel da diversidade microbiana presente nas amostras (Oxford Nanopore Technologies 2020; Wang et al. 2021).

A tecnologia Nanopore permite ainda a sequenciação em tempo real, o que facilita a análise de dados no momento da colheita e é ideal para estudos de campo, onde o tempo entre a colheita das amostras e a sua análise pode comprometer a integridade das mesmas. Podem ser utilizados dispositivos portáteis, como o MinION, em locais remotos, permitindo a investigação das comunidades microbianas no momento exato da colheita (Goodwin et al. 2016; Oxford Nanopore Technologies 2020).

Para o estudo do microbioma oral, a capacidade de realizar long reads é especialmente vantajosa. O sistema Nanopore permite a análise completa de genes como o que codifica o rRNA 16S, incluindo regiões conservadas e hipervariáveis, que são fundamentais para a classificação precisa e a diferenciação de espécies microbianas (Wang et al. 2021) (figura 7). A tecnologia possibilita também a criação de bibliotecas nativas sem amplificação, minimizando o enviesamento da sequenciação e assegurando que as leituras representam de forma fiel as amostras originais (Goodwin et al. 2016; Cunha et al. 2021).

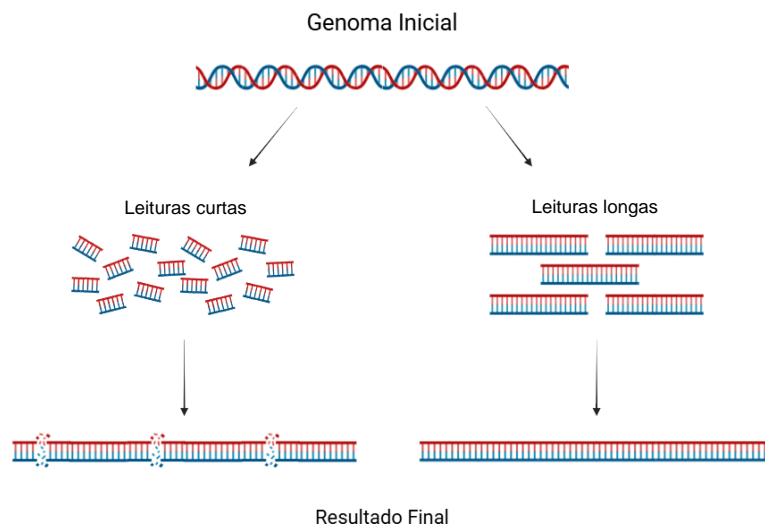


Figura 7. Comparação entre tecnologias de sequenciação de *short reads* e *long reads*. À esquerda, a abordagem de *short reads* fragmenta o genoma em milhares de peças, dificultando uma montagem precisa. À direita, a tecnologia de *long reads* permite a reconstrução genômica com muito menos fragmentos e facilita a análise da estrutura genômica e a identificação de variantes complexas. Criado com BioRender.com

O impacto das tecnologias de sequenciação de terceira geração no estudo de microbiomas é substancial, pois estas constituem uma ferramenta poderosa para a compreensão das interações entre o hospedeiro e os microrganismos presentes na sua microbiota. A geração de *long reads* abre novas possibilidades para estudos detalhados e comparativos de microbiomas em diferentes condições, com potencial para identificar biomarcadores e desenvolver intervenções terapêuticas com base nas composições microbianas (Oxford Nanopore Technologies 2019; Wang et al. 2021).

4.4. Análise Bioinformática e Classificação Taxonômica

As long reads geradas pela técnica de sequenciação Nanopore são ideais para classificações taxonômicas de alta precisão, particularmente quando é aplicado o método Lowest Common Ancestor (LCA). Esta abordagem permite associar cada leitura ao menor nível taxonômico possível, reduzindo ambiguidades e garantindo uma classificação robusta, especialmente em amostras de alta diversidade (Oxford Nanopore Technologies 2019; Wang et al. 2021). Para uma análise completa da diversidade presente na amostra, são utilizadas métricas como o teste de Kruskal-Wallis, no sentido de avaliar a significância da diversidade alfa, e o PCoA (Análise de Coordenadas Principais) para explorar a diversidade beta entre amostras. Essas metodologias permitem uma comparação detalhada entre grupos de amostras, pois possibilitam a identificação de biomarcadores microbianos significativos para cada grupo (Goodwin et al. 2016; Wang et al. 2021).

4.5. Comparação entre Técnicas de Sequenciação para análise do Microbioma

As técnicas de sequenciação utilizadas na análise de microbiomas incluem principalmente a sequenciação de nova geração (NGS), correspondente à tecnologia de 2.^a geração, e a sequenciação de longas leituras (*long reads*), associada à 3.^a geração, como é o caso da Oxford Nanopore. O NGS revolucionou a pesquisa microbiológica ao permitir a leitura de milhares de fragmentos curtos simultaneamente, sendo amplamente utilizado devido à sua alta precisão e custo relativamente acessível. No entanto, esta abordagem apresenta limitações significativas, especialmente para a montagem de genomas completos e para a análise de regiões repetitivas e estruturalmente complexas, devido ao comprimento reduzido das leituras obtidas (Goodwin et al. 2016).

Em contrapartida, a tecnologia de *long reads* da Nanopore permite sequenciar fragmentos muito mais extensos, facilitando a análise de genomas inteiros e possibilitando a identificação precisa de variantes estruturais. Essa capacidade é crucial para o estudo de microbiomas complexos, como o oral, onde a resolução detalhada das comunidades microbianas depende da capacidade de identificar toda a diversidade taxonômica presente (Oxford Nanopore Technologies 2020b).

Enquanto o NGS exige a fragmentação extensiva do DNA, o que pode gerar enviesamento e comprometer a representatividade das amostras, a tecnologia Nanopore permite a criação de bibliotecas nativas e minimiza a necessidade de realização de etapas de amplificação, preservando a integridade das sequências originais, o que garante uma maior certeza na identificação e representatividade das populações microbianas (Cunha et al. 2021).

Portanto, embora o NGS ofereça vantagens em termos de custo e seja adequado para análises de grande escala, a sequenciação de *long reads* da Nanopore é mais indicada para análises que requerem precisão na montagem de genomas e na resolução de comunidades microbianas complexas. A escolha da técnica depende do objetivo do estudo, mas a capacidade de capturar *long reads* e realizar análises em tempo real faz com que a tecnologia Nanopore seja considerada uma ferramenta robusta para o estudo detalhado do microbioma (Goodwin et al. 2016; Oxford Nanopore Technologies 2019).

IV- AVALIAÇÃO DO MICROBIOMA ORAL EM COELHOS (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*) COM E SEM DOENÇA DENTÁRIA

1. Material e Métodos

1.1. Considerações éticas

Anteriormente à colheita das amostras, foi obtido o consentimento informado por escrito, dos tutores de todos os coelhos envolvidos no estudo, com vista à obtenção de material biológico e análise dos dados obtidos (anexo 1). Todas as amostras foram obtidas pelo autor ou por veterinários treinados durante consultas de rotina ou no início de procedimentos cirúrgicos, seguindo procedimentos padrão realizados de forma indolor para os animais envolvidos. Não foi realizado qualquer tipo de experimentação animal no âmbito deste estudo.

1.2. População alvo

O presente estudo foi realizado com base na caracterização de um total de 27 amostras, obtidas entre 6 de março e 8 de abril de 2024, da mucosa oral de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) apresentados à consulta no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade de Lisboa, na Exoclinic- Clínica Veterinária de Aves e Exóticos de Lisboa (Miraflores) e na VetExóticos- Clínica Veterinária de Animais Exóticos (Feijó-Almada).

Os animais amostrados foram divididos em três grupos: 1) animais clinicamente saudáveis (n=9); 2) animais com doença dentária diagnosticada (n=9); e 3) animais com abscesso dentário (n=9).

Para garantir uma recolha de informações abrangente sobre cada animal, foi realizado um inquérito epidemiológico (anexo 2) aos tutores, de modo a obter dados relativos ao historial clínico do animal, incluindo idade, dieta, raça, género, peso e tipo de alojamento e de alimentação.

1.3. Recolha de Amostras

Foram recolhidas duas amostras da mucosa oral de cada animal, através da raspagem da mesma com o auxílio de zaragatoas orais (*Virus Collection and Preservation System*) (figura 8). Cada amostragem foi realizada durante 30 segundos cronometrados, através de movimentos de progressão e regressão e de movimentos rotativos, de modo a garantir a amostragem adequada da microbiota presente na mucosa oral dos animais.

Após a recolha das amostras, as duas zangaratoas respetivas a cada animal foram colocadas num único recipiente com meio de conservação *Virus Preservation Medium* (figura 8), devidamente identificado com a identificação do animal e a data da colheita. Em seguida, as amostras foram armazenadas a 4°C, durante um período máximo de 5 semanas, até que a extração do DNA fosse realizada.

Todas as amostras foram recolhidas de acordo o protocolo descrito anteriormente, e as informações de cada animal foram organizadas numa tabela (anexo 3).



Figura 8. Imagem original do material de recolha e preservação das amostras: recipiente com meio de conservação *Virus Preservation Medium* e 2 zangaratoas orais (*Virus Collection and Preservation System*).

1.4. Caracterização do Microbioma

1.4.1. Processamento das Amostras

As amostras foram processadas pela BioISI Genomics®, Biosystems and Integrative Sciences Institute, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

O DNA total foi extraído a partir de 180 µL do meio de conservação de cada amostra, utilizando o sistema “MGISP-960 High-throughput Automated Sample Preparation System” e o kit de Extração de Ácidos Nucleicos “MGI Easy”, de acordo com as instruções do fabricante. A pureza do DNA foi avaliada por absorvância a 260 nm usando um Espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA). O DNA extraído foi armazenado a –20°C até ao seu processamento. A quantificação foi realizada utilizando o Qubit™ 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, EUA) e os valores obtidos constam na tabela 1.

Tabela 1. Quantificação do DNA extraído a partir das amostras da cavidade oral dos coelhos em estudo.

Número da Amostra	Identificação da Amostra	Concentração de DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Volume de Eluição (μL)	DNA total (μL)
1	90214	6,1	35	213,5
2	5671	7,9		276,5
3	5672	8,5		297,5
4	5685	6		210
5	84487	6		210
6	3120	9,4		329
7	3471	6,1		213,5
8	3472	38		1330
9	70181	6,9		241,5
10	42762	7,4		259
11	9065	24		840
12	6689	5,4		189
13	6106	5,4		189
14	68705	4,2		147
15	8524	5,6		196
16	79780	7		245
17	85483	6,9		241,5
18	76560	4,6		161
19	90445	5,8		203
20	89595	6,6		231
21	6819	7,9		276,5
22	76686	5,2		182
23	5164	3,3		115,5
24	4791	9,8		343
25	6575	8,7		304,5
26	77765	8,6		301
27	89823	4,7		164,5

1.4.2. Amplificação do Gene 16S rDNA e Preparação da Biblioteca para Sequenciação

A amplificação do gene 16S rDNA foi realizada num volume total de 50 μL , utilizando a LongAmp Hot Start Taq 2x master mix (New England Biolabs, MA, EUA) a 1x, a partir de 50 ng/ μL de DNA genómico, através dos *primers* 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') (0,25 μM). As amplificações foram realizadas num termociclador Biometra UNO II, usando as seguintes condições: 1 ciclo a 94 °C durante

1 minuto; 35 ciclos a 94 °C durante 20 segundos, 55 °C durante 30 segundos, e 65 °C durante 2 minutos; e uma extensão final a 65 °C durante 5 minutos. Seguidamente, os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1.5%, a 120V durante 45 minutos, e visualizados no transiluminador Alliance 4.7 (Uvitec Cambridge). Posteriormente, foram purificados usando a técnica de Imobilização Reversível em Fase Sólida (SPRI) com esferas magnéticas.

A biblioteca para sequenciação foi preparada a partir de 200 fmol do produto de PCR purificado após amplificação do gene 16S rDNA, utilizando o Sequencing Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24) (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido), de acordo com as instruções do fabricante.

As reações de sequenciação foram realizadas utilizando células de fluxo R10.4.1 e a plataforma de sequenciação PromethION. Os resultados foram adquiridos em tempo real através do software MinKNOW 18.08.2., e armazenados em ficheiros fastq, com cada ficheiro a representar um conjunto de 4000 leituras.

1.5. Tratamento dos Dados e Análise Estatística

Nesta etapa, os resultados da sequenciação das amostras foram analisados e integrados com o objetivo de estabelecer os perfis microbianos das amostras em estudo, utilizando uma plataforma analítica desenvolvida pela BioSIGenomics® para sequenciação “long-read nanopore”, de modo a obter uma classificação taxonómica de elevada precisão. Os resultados foram validados através do ZymoBIOMICS Microbial Community Standard.

As leituras de baixa qualidade foram eliminadas, e as restantes leituras foram selecionadas por tamanho (foram mantidas as leituras com comprimentos entre 1200 pb e 1700 pb) utilizando o programa Prinseq-lite, de modo a garantir a consistência nos comprimentos das leituras e assegurar a qualidade dos resultados.

Para a classificação taxonómica, foi utilizada uma indexação baseada em *k-mers*, a qual permitiu mapear as sequências obtidas por comparação com o genoma do ancestral comum a todos os genomas conhecidos que contêm um determinado *k-mer*. A rarefação das amostras foi ajustada ao menor número de leituras para garantir uma comparação correta entre as amostras. A classificação foi realizada com recurso à informação disponível nas bases de dados *RefSeq* e *GenBank*, que incluem os dados relativos a Archaea e Bacteria disponibilizados até maio de 2023.

A diversidade alfa foi analisada para caracterizar a riqueza e a distribuição das espécies microbianas nos grupos em estudo (animais clinicamente saudáveis, animais com doença dentária diagnosticada e animais com abscesso dentário). Para esta avaliação, foram determinadas as Unidades Taxonómicas Operacionais (OTUs) observadas (riqueza de

espécies) e calculado o Índice de Shannon, que considera não só a riqueza (número total de espécies presentes) mas também a equitabilidade (distribuição relativa das espécies na comunidade) das amostras, e o Índice de Equitabilidade de Pielou, o qual mede a uniformidade da distribuição das espécies dentro de cada grupo. A representatividade da amostragem foi avaliada por meio da análise de rarefação alfa, através das curvas da progressão das OTUs detetadas em função do número de leituras de sequenciação. A estabilização destas curvas indica que a profundidade de sequenciação foi adequada, assegurando uma representação abrangente da diversidade microbiana existente em cada amostra. No sentido de comparar a diversidade alfa entre os grupos, recorreu-se à construção de boxplots dos valores do Índice de Equitabilidade de Pielou, uma abordagem que permitiu captar as variações na uniformidade das comunidades microbianas. No entanto, a interpretação dessas variações foi realizada após análise estatística. Para esse fim, aplicou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, que possibilitou a detecção de padrões significativos, distinguindo oscilações casuais de discrepâncias biologicamente relevantes.

A diversidade beta, que avalia as diferenças entre os três grupos de coelhos em estudo, foi avaliada através da determinação do Índice de Jaccard por análise das coordenadas principais, realizada através do programa QIIME2, de modo a avaliar a similaridade ou diferença das amostras. A prevalência dos gêneros foi estabelecida considerando um limiar de 0,01% (McLaren et al. 2019).

Posteriormente, recorreu-se ao programa *sankeyD3* para construir árvores filogenéticas com base nas OTUs identificadas nas amostras. As OTUs foram analisadas por meio de mapas de calor, nos quais a abundância de OTUs em cada amostra foi normalizada usando Z-scores, com base num total de 50 OTUs. A dissimilaridade entre amostras foi determinada através do método de Bray-Curtis, e foi realizada uma análise hierárquica de acordo com o método de Ward, através do agrupamento de amostras com padrões de abundância semelhantes.

Posteriormente, a identificação de biomarcadores, definidos como características microbiológicas ou genéticas que distinguem os grupos experimentais, foi realizada de acordo com o método LEfSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size). Para tal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para identificar características (como a abundância relativa de gêneros bacterianos) com diferenças significativas entre os grupos experimentais, sendo que as que apresentaram valor de $p > 0,05$ foram descartadas. As características remanescentes foram submetidas a análises adicionais utilizando o teste não paramétrico de Wilcoxon, para avaliação das diferenças entre as características apresentadas pelos pares de grupos experimentais. Em seguida, foi construído um modelo de Análise Discriminante Linear (LDA), baseado nas diferenças médias das proporções de abundância relativa de cada característica

entre os grupos experimentais. Essas diferenças, expressas em escala logarítmica, geraram a pontuação final de LDA, utilizada para classificar as características de acordo com a sua relevância enquanto biomarcadores (figura 9).

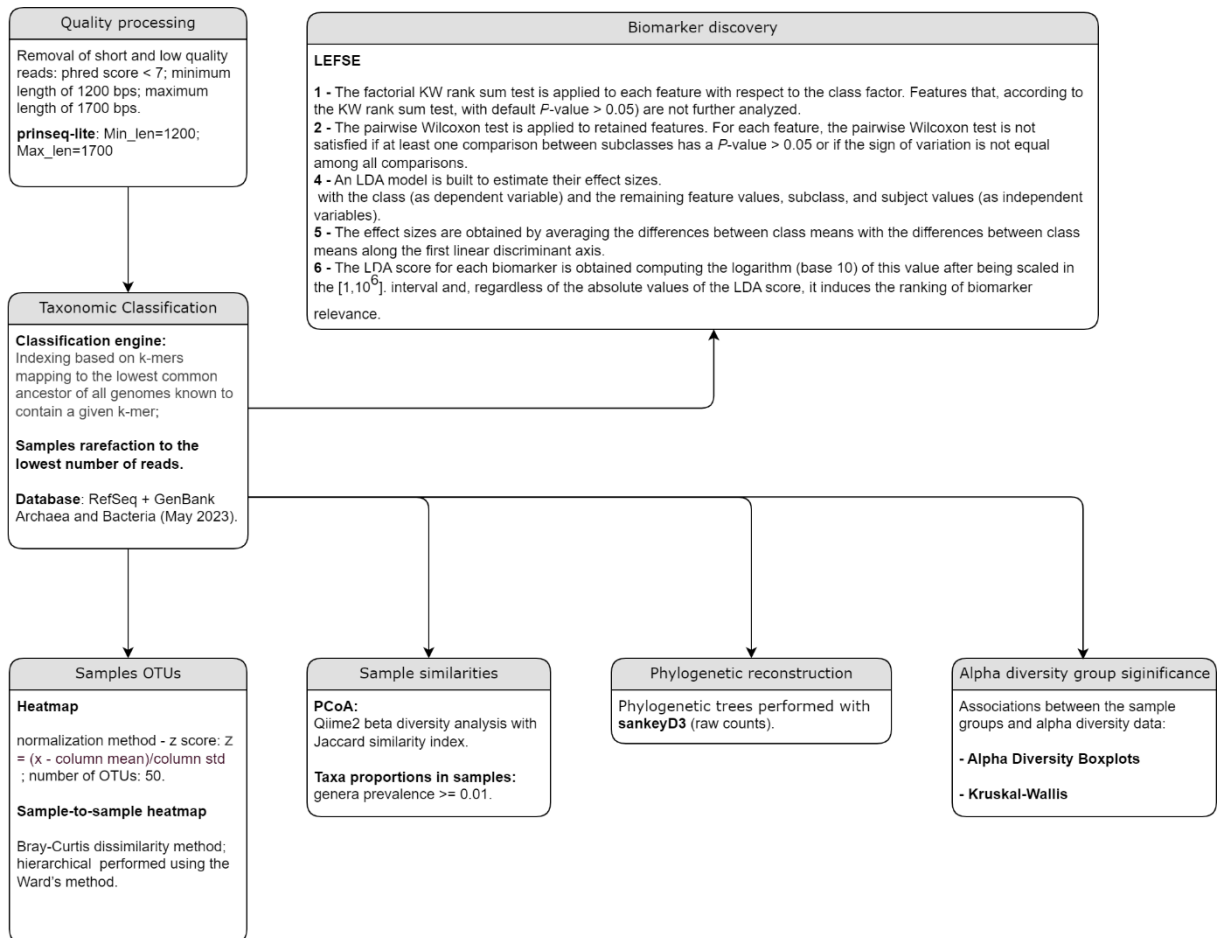


Figura 9. Pipeline analítico utilizado na caracterização do microbioma da cavidade oral dos coelhos em estudo, utilizando *long-read sequencing*.

1.6. Avaliação da Qualidade da Sequenciação

Para avaliar a precisão nos processos de sequenciação foi determinado o Phred quality score (Q), um método padrão amplamente utilizado com esse fim (Pfeifer 2017). Este método permite medir a probabilidade de uma base ser incorporada incorretamente mediante a variação da intensidade do sinal em cada ciclo, refletindo a qualidade e a precisão de uma reação de sequenciação.

Na tecnologia de Sequenciação por Síntese (SBS), é atribuído um *quality score* a cada base incorporada por um algoritmo que segue a equação logarítmica: $Q = -10 \log_{10}(e)$, onde e é a probabilidade estimada de uma base ser incorporada incorretamente. Quanto maior for o valor de Q , menor é a probabilidade de erro; uma pontuação Q baixa pode corresponder a

resultados incorretos, e a um aumento de falsos positivos devido à incorporação de variantes, e originar conclusões imprecisas.

Em termos práticos, considera-se que, quando o Phred quality score é $\geq Q30$, todas as leituras serão corretas, sem erros, sendo o valor de referência para avaliação da qualidade dos resultados das técnicas de sequenciação de nova geração (NGS).

Tabela 2. Índice de qualidade e exatidão na leitura de bases

Índice de Qualidade Phred (Q)	Probabilidade de Erro na Determinação da Base	Exatidão da Leitura de Bases
10	1 em cada 10 leituras de sequenciação de pares de bases	90%
20	1 em 100	99%
30	1 em 1000	99,9%

2. Resultados

Os resultados obtidos foram inicialmente avaliados quanto à precisão da sequenciação. Em seguida, foram estruturados de forma a permitir avaliar a composição do microbioma oral dos animais em estudo e comparar as abundâncias relativas dos grupos taxonômicos bacterianos presentes nos diferentes grupos de coelhos inseridos no trabalho. Os grupos taxonômicos presentes em todas as amostras foram definidos como a *core microbiota* dos animais em estudo, enquanto os grupos que estavam ausentes em algumas amostras permitiram estabelecer as diferenças inter e intra grupos, estabelecidas de acordo com os índices de diversidade alfa e beta.

2.1. Avaliação da Qualidade da Sequenciação

A avaliação da qualidade de sequenciação tem como objetivo avaliar a qualidade das leituras obtidas no processo de sequenciação, bem como a precisão da leitura de bases. Este processo utiliza um algoritmo que identifica, com base nos sinais gerados, o nucleótido correspondente (A, T, C ou G) em cada posição da sequência de ADN.

As reações de sequenciação realizadas apresentaram um Phred Quality Score de 17.2, que corresponde a uma taxa de erro por base de aproximadamente 1 em 50 nucleótidos, e a uma precisão de aproximadamente 97%.

Após a avaliação da qualidade das leituras de sequenciação, foi contabilizado um total de 4.811.803 sequências. Destas, 4.811.668 foram identificadas como pertencentes aos domínios Archaea e Bacteria. O número de sequências variou entre 267.097 e 81.243 por amostra individual, refletindo diferenças na quantidade de dados obtidos a partir das amostras analisadas.

2.2. Caracterização da População em Estudo

A caracterização demográfica, de manejo e de historial clínico de cada grupo foi realizada com base na informação recolhida através de inquérito epidemiológico (anexo 3).

O grupo de coelhos saudáveis foi composto por quatro fêmeas e cinco machos. A idade dos animais variou entre os 8 meses e os 7 anos. As raças presentes neste grupo foram Lion Head (n=4), Anão (n=3) e Lop (n=2). O peso dos animais variou de 1 kg a 2,3 kg, com uma média aproximada de 1,69 kg.

Relativamente ao alojamento, a maioria dos coelhos (n=5) vivia num parque, três em regime livre e um em gaiola. Sete dos nove coelhos tinham acesso exterior. A ração base da dieta era maioritariamente pellets, com apenas um coelho a consumir muesli. O feno era fornecido a oito dos nove coelhos. A dieta era complementada com uma variedade de extras, incluindo legumes, fruta fresca, aveia, biscoitos naturais e pão.

No que diz respeito ao historial clínico, nenhum dos coelhos deste grupo apresentava histórico de procedimento dentário, doença dentária ou abscesso dentário. Apenas um coelho estava sob tratamento em curso com Sulfametoxazol + Trimetropim.

O grupo de coelhos com doença dentária foi constituído por quatro fêmeas e cinco machos. A idade dos animais variou de 3 a 11 anos, com seis indivíduos classificados como adultos. As raças mais representadas foram Belier (n=4), Anão (n=3) e Angorá (n=2). O peso dos animais variou de 1 kg a 1,99 kg, com uma média aproximada de 1,52 kg.

Relativamente ao alojamento, quatro coelhos viviam em gaiola, três em regime livre e dois num parque. Apenas três dos nove coelhos tinham acesso exterior. A ração base era pellets para cinco animais e muesli para quatro. O feno era fornecido a quatro coelhos, enquanto cinco não o recebiam/consumiam. Os extras na dieta incluíam vegetais, frutas e couve-flor, embora apenas em alguns animais.

O historial clínico deste grupo revelou que todos os animais possuíam historial de doença dentária, com cinco coelhos a terem realizado mais de um procedimento dentário. Apenas um coelho tinha histórico de abscesso dentário. Três coelhos estavam sob tratamento em curso, sendo que sete dos nove coelhos tinham histórico de antibioterapia, com uma variedade de fármacos como enrofloxacina, amicacina, doxiciclina, metronidazol e azitromicina. Quatro coelhos apresentavam histórico de doença ocular e dois histórico de doença respiratória.

O grupo de coelhos com abscesso dentário foi composto por quatro fêmeas e cinco machos. A idade dos animais variou de 1 a 10 anos. As raças predominantes foram Belier (n=4) e Anão (n=4), com um coelho da raça Lion Head. O peso dos animais variou de 1,11 kg a 2,42 kg, com uma média aproximada de 1,68 kg.

Quanto ao alojamento, seis coelhos viviam em regime livre, dois em gaiola e um no exterior. Três dos nove coelhos tinham acesso exterior. A ração base era pellets para cinco animais e muesli para quatro. O feno era fornecido a cinco coelhos, enquanto quatro não o recebiam. Os extras na dieta eram variados, incluindo legumes e fruta, e alguns registos estavam vazios.

No que se refere ao historial clínico, seis dos nove coelhos tinham histórico de procedimentos dentários e de doença dentária, com cinco a terem realizado mais de um procedimento. Cinco coelhos tinham histórico de abscesso dentário. Três coelhos tinham finalizado recentemente uma antibioterapia à base de penicilina. Sete dos nove coelhos tinham histórico de antibioterapia, com registos de enrofloxacina, penicilina, azitromicina e amoxicilina + ácido clavulânico. Nenhum dos coelhos deste grupo tinha histórico de doença ocular ou respiratória.

2.3. Diversidade Taxonómica

A diversidade taxonómica corresponde ao número total de grupos taxonómicos presentes nas amostras em estudo, tendo sido possível observar que o microbioma oral dos coelhos em estudo incluía um total de 24 filós, 31 classes, 68 ordens, 151 famílias, 481 géneros e 1400 espécies bacterianas.

Relativamente aos filós presentes nos diferentes grupos de animais, foi possível identificar 12 filós a partir das amostras de coelhos saudáveis, 20 a partir das amostras de coelhos com doença dentária, e 18 a partir das amostras de coelhos com abscesso dentário. Foi possível observar Pseudomonadota, Bacillota, Bacteroidota, Fusobacteriota e Actinomycetota nas amostras de todos os grupos. Saccharibacteria foi apenas identificado nas amostras dos coelhos saudáveis, encontrando-se ausente nas amostras dos coelhos com doença dentária e nas dos animais com abscessos dentários. Por outro lado, Campylobacterota foi identificado apenas nas amostras de coelhos com abscessos dentários, não estando presente nas amostras obtidas a partir dos outros dois grupos de animais em estudo.

Relativamente às classes, foram identificadas 23 classes diferentes nas amostras de coelhos saudáveis, 28 nas de coelhos com doença dentária e 27 nas de animais com abscesso dentário. Foi também possível identificar 45 ordens diferentes nas amostras de coelhos saudáveis, 57 nas de animais coelhos com doença dentária, e 57 nas de coelhos com abscesso

dentário. Em relação às famílias, foi possível identificar um total de 99 famílias nas amostras de coelhos saudáveis, 115 nas de coelhos com doença dentária, e 123 nas de coelhos com abscesso dentário.

Foi ainda possível verificar que as amostras de coelhos saudáveis apresentaram uma menor diversidade a nível dos géneros identificados, apresentando 303 géneros diferentes, de entre os quais se destacaram os géneros *Bibersteinia*, *Rodentibacter*, *Chryseobacterium* e *Avibacterium*. Nas amostras dos coelhos com doença dentária, foi possível detetar um total de 371 géneros, incluindo *Streptococcus*, *Bibersteinia* e *Porphyromonas*. Por fim, nas amostras de coelhos com abscessos dentários, foram identificados 357 géneros, incluindo *Bibersteinia*, *Porphyromonas*, *Bacteroides*, *Rodentibacter* e *Pasteurella*.

Por fim, foi possível identificar 853 espécies diferentes nas amostras de coelhos saudáveis, 1041 nas de coelhos com doença dentária, e 980 nas de coelhos com abscesso dentário. Assim, verificou-se um aumento da diversidade total nos grupos de animais com doença oral.

2.4. Abundância Relativa

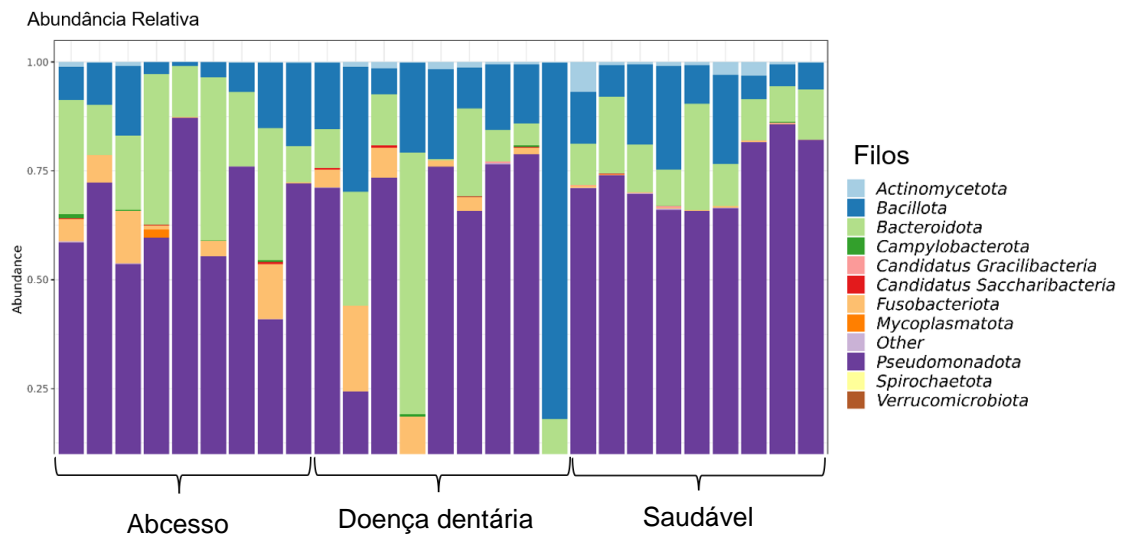
A abundância relativa, que expressa a proporção de um determinado grupo taxonómico em relação ao total de grupos observados numa determinada amostra, revelou algumas diferenças na composição do microbioma oral dos animais.

Nas amostras do grupo dos coelhos saudáveis, o filo Pseudomonadota apresentou a maior abundância relativa, com um valor de 73,59%, seguido de Bacteroidota (12,18%) e Bacillota (11,90%). Actinomycetota apresentou uma abundância relativa de 1,85% e Fusobacteriota de 0,24%. Os outros filios apresentaram de abundâncias relativas inferiores a 0,10%. Já nas amostras de coelhos com doença dentária, Pseudomonadota apresentou uma abundância relativa de 52,72%, enquanto Bacillota e Bacteroidota apresentam valores de 23,46% e 16,90%, respetivamente. Fusobacteriota e Actinomycetota apresentaram um aumento na sua abundância relativa para 5,69% e 0,79, respetivamente. Os restantes filios apresentam valores de abundância relativa inferiores a 0,25%. Nas amostras do grupo de coelhos com abscesso dentário, Pseudomonadota foi novamente o filo mais abundante, com uma abundância relativa de 63,66%, seguido de Bacteroidota (21,54%), Bacillota (9,06%), Fusobacteriota (4,54%) e Actinomycetota (0,30%), sendo que os restantes filios apresentaram valores de abundância relativa inferiores a 0,23%.

De um modo geral, observou-se que o filo Pseudomonadota foi predominante em todos os grupos, sendo a sua abundância superior nos coelhos saudáveis. Por outro lado, observou-se uma maior proporção de Bacteroidota e Bacillota nas amostras dos grupos de animais com abscesso e doença dentária em relação às do grupo de coelhos saudáveis. Além

disso, foram identificados outros filós em menor abundância, como Fusobacteriota e Actinomycetota, cuja presença, embora reduzida, contribuiu para evidenciar a diversidade microbiana distinta observada entre os grupos (gráfico 1).

Gráfico 1. Abundância relativa dos filós bacterianos presentes no microbioma oral dos coelhos em estudo.



Foi, ainda, possível observar diferenças em relação aos gêneros presentes nas amostras obtidas a partir dos três grupos de coelhos em estudo. Nas amostras de coelhos saudáveis, o gênero *Bibersteinia* destacou-se como o mais abundante, representando 20,25% da comunidade bacteriana total deste grupo, seguido de *Rodentibacter* (13,05%), *Streptococcus* (7,79%), *Pelistega* (7,45%) e *Pasteurella* (2,08%). A categoria "Outros" juntamente com a "Desconhecidos" representou 20,89% da comunidade bacteriana total deste grupo.

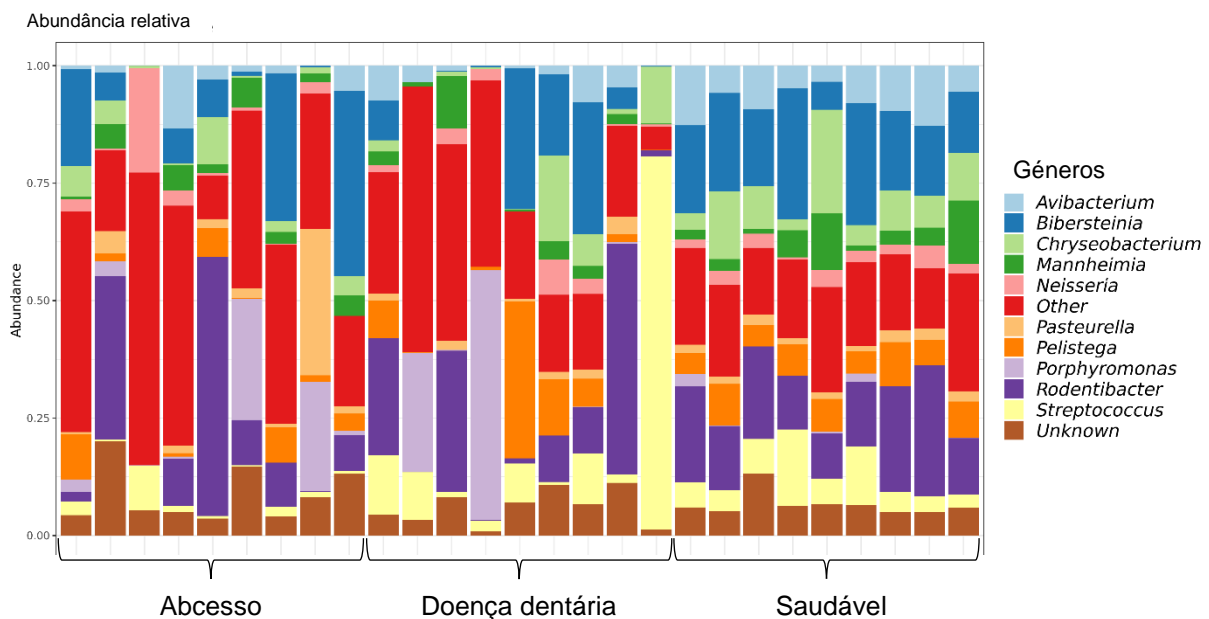
Nas amostras de coelhos com doença dentária, o gênero *Streptococcus* foi predominante, com uma abundância relativa de 16,21%, seguido de *Bibersteinia* (11,34%), *Porphyromonas* (10,10%), *Pelistega* (7,90%) e *Rodentibacter* (8,25%). O gênero *Pasteurella* mostrou-se menos abundante nestas amostras, representando apenas 1,42% da comunidade bacteriana, enquanto as categorias "Outros" e "Desconhecidos" representou 30,48% na sua totalidade.

Nas amostras de coelhos com abscesso dentário, o gênero *Bibersteinia* foi novamente o mais representativo, com uma abundância relativa de 15,37%, seguido de *Porphyromonas* (7,60%), *Bacteroides* (6,86%), *Rodentibacter* (6,59%) e *Pasteurella* (5,95%). O gênero *Streptococcus*, embora presente, apresentou uma abundância relativa de apenas 2,51%. Adicionalmente, a categoria "Outros" e "Desconhecidos" corresponderam a 41,91%,

revelando que este grupo de animais apresenta uma elevada diversidade ainda não caracterizada.

De um modo geral, observou-se que o género *Bibersteinia* foi predominante nos coelhos saudáveis, mantendo uma abundância elevada nos coelhos com doença dentária e abscesso dentário, outros géneros também predominantes nos coelhos saudáveis foram *Rodentibacter*, *Chryseobacterium*, *Avibacterium* e *Pelistega*, sendo que este último teve igual presença no grupo de coelhos com doença dentária. No entanto, o género *Streptococcus* destacou-se como o mais abundante nesse grupo, apesar da sua presença ter sido reduzida nos coelhos com abscesso dentário. Já o género *Porphyromonas* apresentou proporções elevadas nos grupos com abscesso dentário e doença dentária. Seguido de outros géneros como *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Bacteroides* e *Fusobacterium*, os quais registaram abundâncias relativas mais elevadas nos coelhos com abscesso dentário comparativamente aos outros grupos (gráfico 2).

Gráfico 2. Abundância relativa dos géneros bacterianos presentes no microbioma oral dos coelhos em estudo.



2.5. Core Microbiota

Os resultados obtidos a partir da sequenciação permitiram ainda identificar a *core microbiota* presente na mucosa oral dos animais amostrados, definida como o conjunto de todas as categorias taxonómicas presentes na totalidade das amostras em estudo. Assim, foi possível

constatar que a *core microbiota* destes animais compreende 5 filios, 9 classes, 15 ordens, 20 famílias, 28 géneros e 31 espécies (tabela 3).

Tabela 3. Core microbiota da cavidade oral dos animais em estudo.

Filo	Classe	Ordem	Família	Género	Espécie
Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae	<i>Rodentibacter</i>	<i>Rodentibacter haemolyticus</i>
				<i>Glaesserella</i>	<i>Glaesserella parasuis</i>
				<i>Aggregatibacter</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
				<i>Bibersteinia</i>	<i>Bibersteinia trehalosi</i>
				<i>Mannheimia</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>
					<i>Mannheimia varigena</i>
				<i>Pasteurella</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
				<i>Actinobacillus</i>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
					<i>Actinobacillus equuli</i>
				<i>Avibacterium</i>	<i>Avibacterium paragallinarum</i>
	<i>Haemophilus</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>			
	n/a	<i>Pasteurellaceae bacterium RH1A</i>			
		Enterobacterales	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
				<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella enterica</i>
		Moraxellales	Moraxellaceae	<i>Moraxella</i>	<i>Moraxella cuniculi</i>
Betaproteobacteria	Burkholderiales		Alcaligenaceae	<i>Pelistega</i>	<i>Pelistega ratti</i>
			Oxalobacteraceae	<i>Herbaspirillum</i>	
			Comamonadaceae	<i>Comamonas</i>	
			Neisseriaceae	<i>Neisseria</i>	
			Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	<i>Oryzomicrobium</i>
Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	<i>Brevundimonas</i>		
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	<i>Porphyromonas</i>	
	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Weeksellaceae		
			Flavobacteriaceae	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Chryseobacterium taklimakanense</i>
					<i>Chryseobacterium</i> sp.
				<i>Capnocytophaga</i>	
			<i>Bergeyella</i>	<i>Bergeyella cardium</i>	
Bacillota	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
					<i>Streptococcus agalactiae</i>
					<i>Streptococcus pneumoniae</i>
					<i>Streptococcus thermophilus</i>
					<i>Streptococcus infantis</i>
					<i>Streptococcus salivarius</i>
					<i>Streptococcus anginosus</i>
					<i>Ligilactobacillus salivarius</i>
			Lactobacillaceae	<i>Ligilactobacillus</i>	
			Carnobacteriaceae	n/a	<i>Carnobacteriaceae bacterium zg-C25</i>
	Bacillales	Bacillaceae			
Negativicutes	Veillonellales	Veillonellaceae	<i>Veillonella</i>	<i>Veillonella parvula</i>	
Actinomycetota	Actinomycetes	Micrococcales	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i>	
		Mycobacteriales			
Fusobacteriota	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	<i>Fusobacterium</i>	
			Leptotrichiaceae	<i>Leptotrichia</i>	<i>Leptotrichia</i> sp. oral taxon 221

2.6. Análise da Diversidade

2.6.1. Diversidade Alfa

A diversidade alfa permite avaliar a diversidade de espécies dentro de uma única amostra ou grupo, tendo sido determinada neste estudo através do cálculo do Índice de Equitabilidade de Pielou. Este índice foi comparado entre os três grupos de coelhos, utilizando o teste de Kruskal-Wallis. O qual revelou diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre a diversidade alfa do microbioma oral de coelhos saudáveis e a do microbioma oral dos animais com alguma forma de doença dentária (PSADD ou abscesso dentário). Contudo, as diferenças

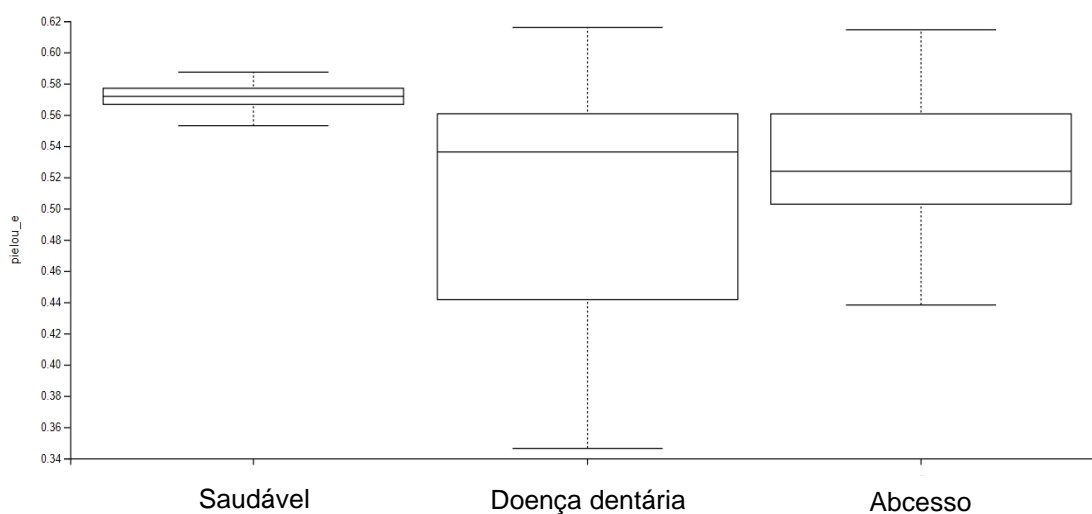
não foram estatisticamente significativas relativamente aos índices de diversidade alfa entre os coelhos com doença dentária e os animais com abscesso dentário, o que sugere que a presença de doença dentária pode estar associada a alterações da diversidade microbiana oral comparativamente à de coelhos saudáveis, independentemente da presença ou não de abscesso (tabela 4).

Tabela 4. Comparações individuais entre os grupos de amostras, realizadas através do teste de Kruskal-Wallis, com um nível de significância estabelecido em $p \leq 0,05$.

Grupo 1	Grupo 2	H	valor-p	valor-q
Abcesso	DD	0,06	0,8	0,8
Abcesso	Saudável	15,76	0,0000718	0,000215
DD	Saudável	11,44	7,19E-04	1,08E-03

O Índice de Equitabilidade de Pielou foi determinado para todos os grupos, permitindo analisar a distribuição e uniformidade dos grupos taxonómicos presentes em cada um dos grupos de animais em estudo. Foi possível observar que as amostras obtidas a partir de coelhos saudáveis apresentavam uma distribuição mais uniforme das espécies constituintes do microbioma oral, enquanto as amostras dos grupos de animais com doença dentária e abscesso dentário apresentaram uma menor uniformidade a nível das espécies identificadas. Por outro lado, a mediana da diversidade alfa foi visivelmente superior nos coelhos saudáveis, indicando uma maior variação da comunidade microbiana em comparação à presente nas amostras dos outros dois grupos de coelhos em estudo (gráfico 3).

Gráfico 3. Boxplot do Índice de Equitabilidade de Pielou aplicado aos três grupos de coelhos em estudo.

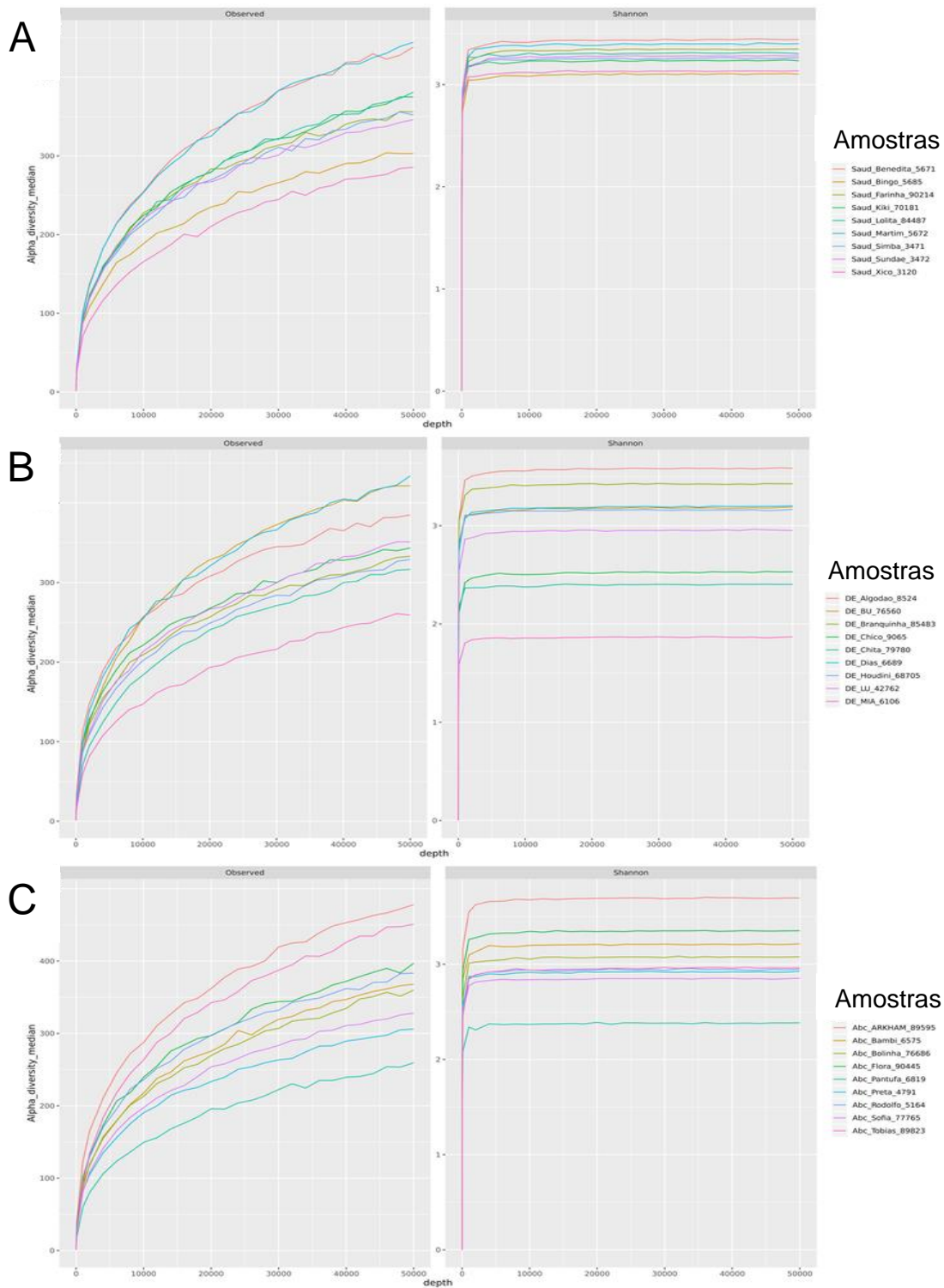


A análise de rarefação alfa foi realizada para avaliar a riqueza taxonômica e a diversidade microbiana dentro de cada grupo de coelhos. Foram construídas curvas de rarefação para duas métricas diferentes: o número de OTUs observadas e o Índice de Shannon. Ambos os casos consideraram a profundidade de sequenciação para cada amostra.

As curvas de rarefação, baseadas no total de OTUs observadas, evidenciaram diferenças na riqueza microbiana entre os três grupos. No grupo de coelhos saudáveis, a maioria das amostras apresentou uma tendência de crescimento contínuo, com algumas curvas atingindo um plateau, o que indicou uma cobertura satisfatória da diversidade microbiana. Nos coelhos com doença dentária notou-se uma redução na riqueza microbiana em algumas amostras, que apresentaram um número de OTUs mais baixo, em comparação com os coelhos saudáveis. No grupo de coelhos com abscesso dentário, determinadas amostras obtiveram um número elevado de OTUs, enquanto outras demonstraram uma diversidade mais reduzida.

As curvas de rarefação, construídas com base no índice de Shannon, complementam estas observações. No grupo de coelhos saudáveis, as curvas de Shannon atingiram rapidamente um plateau, indicando uma comunidade microbiana mais diversa e com uma distribuição mais equilibrada das espécies. No grupo de coelhos com doença dentária, algumas curvas apresentam um plateau inferior às do grupo de coelhos saudáveis, sugerindo uma redução na diversidade dessas amostras. No grupo de coelhos com abscesso dentário (C), a heterogeneidade observada na riqueza foi corroborada, com algumas amostras apresentando valores de diversidade de Shannon próximos aos dos coelhos saudáveis, enquanto outras exibiram valores notavelmente mais baixos, reforçando a variabilidade da diversidade microbiana neste grupo (gráfico 4).

Gráfico 4. Curvas de rarefação relativas às OTUs observadas (à esquerda) e ao Índice de Shannon (à direita) nos diferentes grupos de coelhos: saudáveis (A), com doença dentária (B) e com abscesso dentário (C).

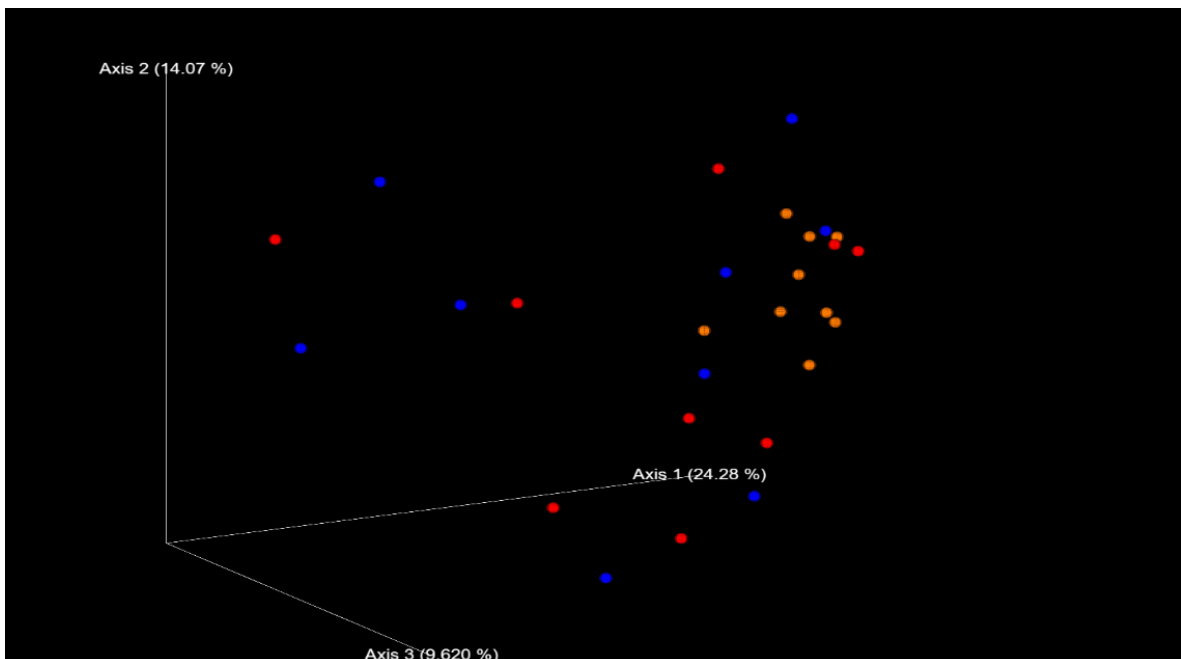


2.6.2. Diversidade Beta

A diversidade beta desempenhou um papel essencial na avaliação das diferenças na composição do microbioma oral dos 3 grupos de coelhos em estudo. Para explorar essas variações, recorreu-se à Análise de Coordenadas Principais (PCoA), uma abordagem visual que traduz as complexas interações microbianas em dimensões mais acessíveis à interpretação. Adicionalmente, foi calculada a matriz de distância de Jaccard, um método rigoroso que se concentra exclusivamente na presença ou ausência das espécies, ignorando deliberadamente a sua abundância relativa. Esta combinação metodológica assegurou uma compreensão aprofundada das variações microbianas entre os grupos, destacando padrões relevantes.

A análise do Gráfico 5 permitiu verificar que os pontos cor de laranja, correspondentes aos coelhos saudáveis, encontraram-se concentrados numa área específica do gráfico, o que indicou que o microbioma presente na cavidade oral destes animais apresentou perfis de similaridade próximos entre si. Os pontos azuis, representativos dos coelhos com doença dentária, encontraram-se mais dispersos no gráfico, o que sugeriu uma maior variabilidade na composição do microbioma desses indivíduos. Os pontos vermelhos, que representaram os coelhos com abscesso dentário, formaram um grupo distinto, encontrando-se mais dispersos no gráfico quando comparados com os pontos laranja (coelhos saudáveis), mas menos que os pontos azuis (coelhos com doença dentária).

Gráfico 5. Gráfico PCoA baseado na matriz de distância de Jaccard. A laranja encontram-se representados os animais saudáveis, a azul os que apresentam doença dentária e a vermelho os com abscesso dentário.



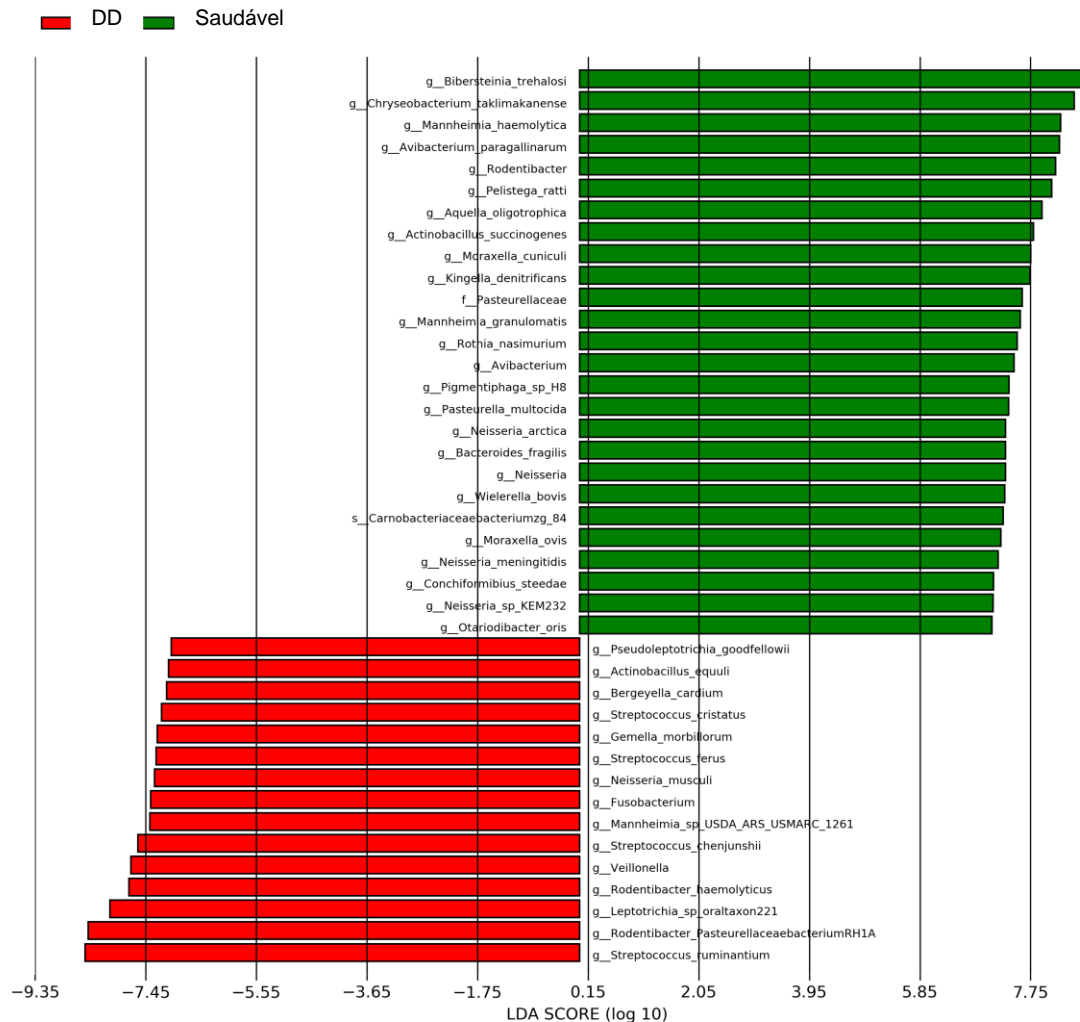
2.7. Análise Discriminante Linear

O tamanho do efeito da Análise Discriminante Linear (LEfSe) permite identificar as características (neste caso, unidades taxonómicas) que são diferenciais entre grupos, e que podem ser potencialmente consideradas como biomarcadores. O processo de identificação dessas características fundamenta-se em três pilares: a significância estatística, determinada através dos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Wilcoxon; a solidez da variação observada entre os grupos, assegurando que as discrepâncias detetadas não são meras flutuações estocásticas, mas sim reflexos consistentes da estrutura biológica subjacente; e a magnitude do impacto discriminativo, mensurada pela pontuação da Análise Discriminante Linear (LDA), que quantifica o grau de separação conferido por cada característica na diferenciação entre grupos.

Neste caso, a análise LEfSe foi realizada para identificar os géneros e espécies bacterianas mais abundantes de cada um dos três grupos de coelhos em estudo, permitindo identificar os OTUs associados a cada caso, evidenciando potenciais marcadores de saúde e de doença.

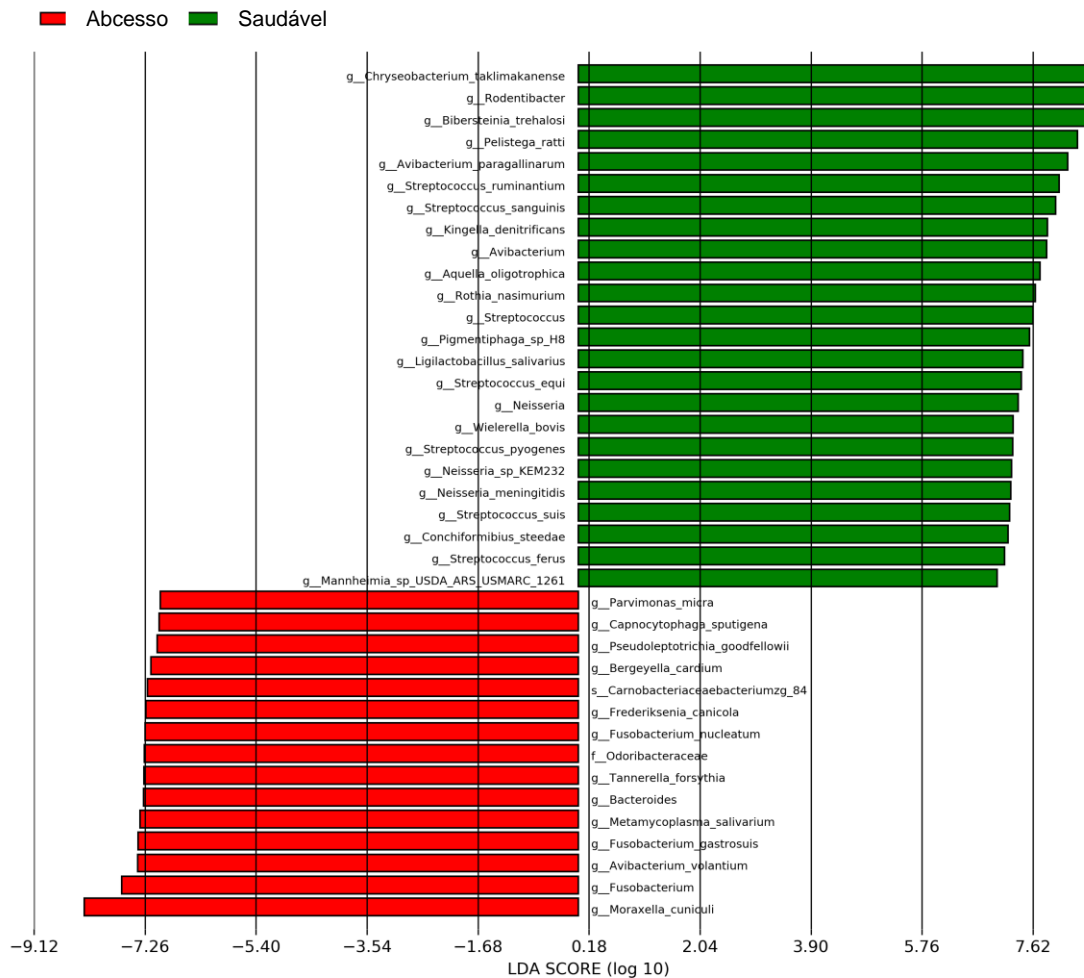
A análise comparativa entre os resultados obtidos para coelhos saudáveis e pelos afetados por doença dentária evidenciou discrepâncias na composição bacteriana, revelando potenciais associações microbianas com a patogénese da condição. No grupo de coelhos saudáveis, as espécies *Bibersteinia trehalosi*, *Chryseobacterium taklimakanense*, *Mannheimia haemolytica*, *Avibacterium paragallinarum*, *Pelistega ratti* e um táxon pertencente ao género *Rodentibacter* foram predominantes. Em contrapartida, os coelhos com doença dentária apresentaram um perfil bacteriano distinto, caracterizado por uma maior abundância de *Streptococcus ruminantium*, *Pasteurellaceae bacterium*, bem como de táxons pertencentes aos géneros *Rodentibacter* e *Leptotrichia*, indicando potenciais alterações associadas ao desenvolvimento da doença (gráfico 6).

Gráfico 6. Análise diferencial da composição bacteriana do microbioma oral entre o grupo de coelhos saudáveis e de coelhos com doença dentária, determinada pela LEfSe. As barras representam os valores da Análise Discriminante Linear, indicando a magnitude da associação de cada grupo taxonómico com cada um dos grupos de coelhos.



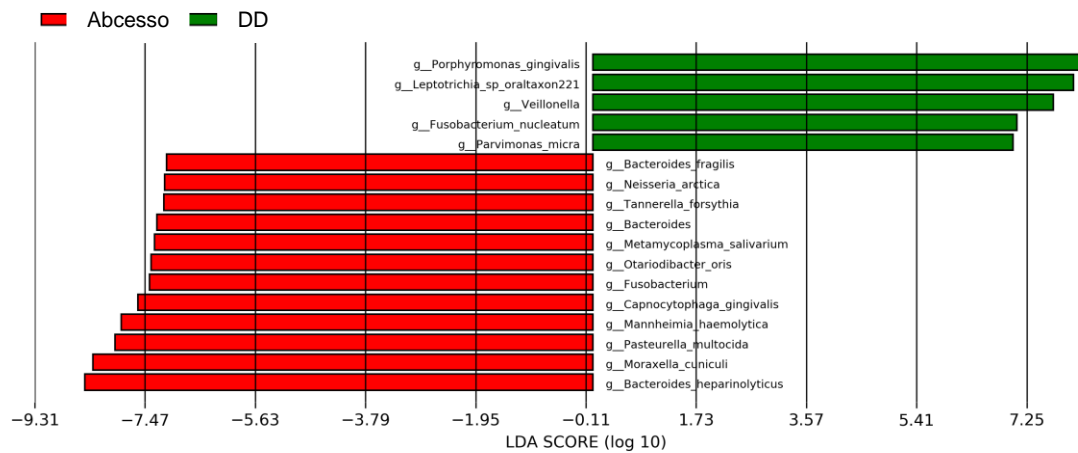
A análise comparativa entre os coelhos saudáveis e os que tinham abscesso dentário revelou contrastes acentuados na composição microbiana. Nos animais saudáveis, o microbioma apresentou uma predominância das espécies *Chryseobacterium taklimakanense*, *Bibersteinia trehalosi*, *Pelistega ratti*, *Avibacterium paragallinarum* e *Streptococcus ruminantium*, bem como um táxon não identificado do género *Rodentibacter*, sugerindo um perfil bacteriano característico de um estado de equilíbrio fisiológico. Já no grupo de coelhos com abscesso dentário, as espécies *Moraxella cuniculi*, *Fusobacterium gastrosuis*, *Avibacterium volantium*, *Metamycoplasma salivarium* e *Bacteroides* sp. destacaram-se como as mais abundantes (gráfico 7).

Gráfico 7. Análise diferencial da composição bacteriana do microbioma oral entre o grupo de coelhos saudáveis e de coelhos com abscesso dentário, determinada pela LfSe. As barras representam os valores da Análise Discriminante Linear, indicando a magnitude da associação de cada grupo taxonómico com cada um dos grupos de coelhos.



Por fim, a análise diferencial entre os grupos de coelhos com doença dentária e com abscesso dentário revelou padrões microbianos distintos, sublinhando potenciais associações entre a composição bacteriana e a progressão da doença. Nos coelhos com doença dentária, registou-se uma maior abundância discriminativa da espécie *Porphyromonas gingivalis*, bem como de táxons não identificados dos géneros *Leptotrichia* sp. e *Veillonella* sp.. Contudo, no grupo de coelhos com abscesso dentário, as espécies identificadas em maiores proporções foram *Bacteroides heparinolyticus*, *Moraxella cuniculi*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* e *Capnocytophaga gingivalis* (gráfico 8).

Gráfico 8. Análise diferencial da composição bacteriana do microbioma oral entre o grupo de coelhos com doença dentária e de coelhos com abscesso dentário, determinada pela LEfSe. As barras representam os valores da Análise Discriminante Linear, indicando a magnitude da associação de cada grupo taxonómico com cada um dos grupos de coelhos.



3. Discussão

Este estudo teve como principal objetivo caracterizar o microbioma oral de coelhos saudáveis, com doença dentária e com abscesso dentário. Esta caracterização possibilitou avaliar a existência de relações entre o microbioma de indivíduos do mesmo grupo, mas também entre o microbioma de animais de grupos diferentes, de modo a compreender se fatores como a presença de doença dentária e a apresentação clínica (com ou sem formação de abscesso) podem influenciar a composição do microbioma oral. Tendo em conta que a bibliografia disponível relativamente a esta temática em coelhos é escassa, foi muitas vezes necessário recorrer à comparação dos resultados obtidos neste estudo com os de outros estudos realizados noutras espécies, para contextualizar os padrões microbianos observados e compreender potenciais implicações funcionais dos grupos bacterianos predominantes.

Os dados obtidos contribuíram, não só para a identificação de potenciais biomarcadores microbianos associados às diferentes condições clínicas, como também forneceram informações valiosas sobre o impacto do microbioma oral no diagnóstico, prevenção e tratamento das doenças dentárias em coelhos. Em particular, a relação entre a diversidade bacteriana e o estado de saúde oral reforça a importância da homeostase microbiana na prevenção de doenças.

3.1. Diversidade microbiana e composição taxonómica

A análise da diversidade de microrganismos nas diferentes amostras em estudo revelou alterações significativas na composição do microbioma oral de coelhos com doença dentária e abscessos em comparação com a dos coelhos saudáveis. A análise da diversidade bacteriana forneceu informações importantes sobre a distribuição e composição das comunidades bacterianas, enquanto a caracterização da composição taxonómica ajudou a identificar as principais diferenças ao nível dos filos e géneros bacterianos relativamente às diferentes condições clínicas.

3.1.1. Diversidade alfa: redução da riqueza microbiana e impacto da disbiose

A diversidade alfa foi quantificada através do Índice de Equitabilidade de Pielou e da análise de rarefação, os quais permitiram quantificar a riqueza e a distribuição relativa das espécies microbianas dentro de cada grupo. Os resultados indicaram uma redução estatisticamente significativa da diversidade alfa nos coelhos com doença dentária e com abscesso dentário em comparação com os coelhos saudáveis ($p \leq 0,05$), sugerindo um processo de disbiose oral. Esta redução favoreceu a dominância de um subconjunto restrito de microrganismos potencialmente patogénicos, o que pode levar a uma eventual alteração da homeostase da cavidade oral. Apesar de não ter sido possível encontrar nenhum estudo que estabeleça uma relação direta entre a diversidade microbiana oral e a estabilidade do ecossistema oral em coelhos, estudos sobre o microbioma intestinal destes animais revelaram que uma maior diversidade microbiana se encontra associada a um ecossistema mais estável (Fortun-lamothe e Boullier 2004; Hu et al. 2021), no qual a competição entre espécies desempenha um papel essencial na regulação da comunidade bacteriana (Fortun-lamothe e Boullier 2004). Por analogia, pode colocar-se a hipótese que o microbioma oral segue um princípio semelhante, funcionando como um ecossistema complexo onde interações microbianas sustentam a estabilidade e a resistência a agentes patogénicos oportunistas. Esta hipótese é consistente com estudos em medicina humana, que demonstraram que o microbioma oral constitui uma comunidade ecológica complexa, altamente regulada, onde interações entre espécies contribuem para a estabilidade do ecossistema e permitem a adaptação a mudanças ambientais (Zarco et al. 2012; Kilian et al. 2016).

Neste estudo foi possível verificar que no microbioma do grupo de coelhos com doença dentária ocorreu uma diminuição da diversidade alfa, o que poderá ter predisposto à colonização da cavidade oral por espécies associadas a processos inflamatórios e à

degradação tecidual, tal como observado em quadros de periodontite noutras espécies animais (Socransky e Haffajee 1992; Hajishengallis e Lamont 2012).

No grupo de coelhos com abscesso dentário, embora a diversidade alfa tenha sido inferior à dos coelhos saudáveis, não foi observada uma redução estatisticamente significativa em relação à dos coelhos com doença dentária ($p=0,8$). Estes resultados sugerem que a principal alteração na diversidade da microbiota ocorre durante a transição do estado saudável para o de doença dentária, enquanto a evolução da doença no sentido da formação de abscesso não se encontra associada a uma redução adicional significativa da diversidade microbiana. Estes resultados podem indicar que, uma vez estabelecida a disbiose associada à doença dentária, a progressão para o estado de abscesso dentário envolve modificações na composição microbiana sem impactar, necessariamente, de forma significativa, a riqueza e equitabilidade global das espécies presentes. Para além de fatores de cada indivíduo (Levy e Mans 2024), o desenvolvimento de abscesso pode estar eventualmente relacionado com a seleção de microrganismos específicos altamente adaptados a um ambiente inflamatório e hipóxico (Harcourt-Brown e Chitty, 2013), e não com a redução geral da diversidade microbiana.

Apesar desta transição não se encontrar completamente caracterizada em coelhos, os resultados deste estudo estão em conformidade com estudos realizados em medicina humana, que demonstraram que a evolução de infeções odontogénicas para estados mais graves tende a ser acompanhada por uma reorganização funcional do microbioma, favorecendo a proliferação de anaeróbios obrigatórios e agentes patogénicos oportunista (Böttger et al. 2021).

3.1.2. Diversidade beta: dissimilaridade entre o microbioma dos três grupos de animais em estudo

A diversidade beta foi analisada com recurso à Análise de Coordenadas Principais (PCoA), baseada na matriz de distância de Jaccard. Este método permitiu avaliar as diferenças entre as amostras, considerando a presença ou ausência das espécies bacterianas.

Os resultados revelaram diferenças entre a composição do microbioma dos três grupos de coelhos em estudo, com graus de sobreposição distintos. O microbioma dos coelhos saudáveis exibiu um padrão relativamente coeso, sugerindo uma composição microbiana semelhante entre os indivíduos deste grupo. Em contraste, os resultados dos coelhos com doença dentária apresentaram uma maior dispersão no gráfico PCoA, o que indica que a composição bacteriana dentro deste grupo é mais heterogénea. Já nos coelhos com abscesso dentário, a tendência foi distinta: os resultados deste grupo formaram um

conjunto separado dos resultados dos animais saudáveis, mas apresentaram pontos de interseção com os resultados do grupo de doença dentária. Algumas amostras ficaram mais próximas das de doença dentária, enquanto outras ficaram localizadas numa posição mais afastada, o que demonstra a existência de uma composição microbiana também passível de sofrer amplas variações.

Após a análise do gráfico 5, observou-se que o microbioma oral dos coelhos saudáveis se diferencia do observado em coelhos com doença dentária e com abscessos dentários. No entanto, a variação observada entre estas duas últimas condições não é marcadamente distinta, existe uma transição gradual e alguma sobreposição na composição microbiana. O facto de as amostras dos coelhos com doença dentária se distribuírem de forma mais dispersa no gráfico PCoA indica que não existe um único perfil bacteriano associado a esta condição. A explicação para essa variabilidade ainda não está totalmente esclarecida no caso dos coelhos (Flenghi et al. 2023), mas poderá estar relacionada com diferenças no grau de progressão da doença, variações individuais entre os animais ou mesmo fatores imunitários e ambientais, tal como previamente observado em estudos relativos à doença periodontal em cães (Wallis et al. 2015; Wallis et al. 2024).

A literatura disponível sobre microbioma oral humano demonstra que a variação na sua composição entre indivíduos saudáveis e indivíduos doentes raramente ocorre de forma brusca. Pelo contrário, são observadas um conjunto de alterações graduais na estrutura e composição da microbiota (Deo e Deshmukh, 2019), influenciadas por fatores como dieta (Zaura et al. 2009), idade (Parahitiyawa et al. 2010) e resposta imune do hospedeiro (Deo e Deshmukh, 2019). Essas variações interindividuais refletem a notável plasticidade ecológica da microbiota oral, e a sua capacidade de adaptação a condições fisiológicas e ambientais distintas. Seguindo esta lógica, a grande dispersão observada nos coelhos com doença dentária poderá provavelmente refletir um fenómeno semelhante: a disbiose oral não ocorre de maneira uniforme, mas ao longo de um gradiente de mudanças, que pode depender da duração e gravidade da condição inflamatória.

No caso do microbioma dos coelhos com abscesso dentário, apesar da clara distinção em relação aos coelhos saudáveis, observou-se uma certa sobreposição com o microbioma dos coelhos com doença dentária. Este resultado sugere que o desenvolvimento de um abscesso não implica uma alteração total da microbiota, mas sim uma evolução dos padrões já presentes na doença dentária. Estudos anteriores realizados em cães e humanos apoiam esta hipótese, mostrando que a composição bacteriana nos estágios iniciais das infeções odontogénicas influencia, diretamente, as fases mais avançadas da doença (Siqueira e Rôças 2013; Wallis et al. 2015). Este padrão sugere que, em vez de uma alteração abrupta das espécies bacterianas, ocorre uma reorganização da estrutura microbiana, favorecendo o

crescimento de organismos anaeróbios estritos e oportunistas, como *Fusobacterium* e *Porphyromonas* (Al-Cafes et al. 2017).

Foi ainda possível verificar que as amostras de coelhos saudáveis apresentaram uma menor diversidade a nível dos géneros identificados, apresentando 303 géneros diferentes, de entre os quais se destacaram os géneros *Bibersteinia*, *Rodentibacter*, *Chryseobacterium* e *Avibacterium*. Nas amostras dos coelhos com doença dentária, foi possível detetar um total de 371 géneros, incluindo *Streptococcus*, *Bibersteinia* e *Porphyromonas*. Por fim, nas amostras de coelhos com abscessos dentários, foram identificados 357 géneros, incluindo *Bibersteinia*, *Porphyromonas*, *Bacteroides*, *Rodentibacter* e *Pasteurella*.

Por fim, foi possível identificar 853 espécies diferentes nas amostras de coelhos saudáveis, 1041 nas de coelhos com doença dentária, e 980 nas de coelhos com abscesso dentário.

3.1.3. Composição taxonómica e diferenças na abundância relativa dos filós e géneros bacterianos

A caracterização do microbioma oral dos coelhos estudados revelou diferenças tanto na diversidade taxonómica, como na abundância relativa dos principais filós e géneros bacterianos, refletindo alterações progressivas na composição microbiana associadas à presença de doença dentária e abscesso dentário.

A diversidade taxonómica foi avaliada através do número total de categorias taxonómicas identificadas em cada grupo. A riqueza taxonómica variou entre os grupos, sendo inferior no grupo de coelhos saudáveis e superior nos grupos com doença dentária e abscesso dentário. Nos coelhos saudáveis, foram identificados 303 géneros e 853 espécies diferentes. No grupo de coelhos com doença dentária, observou-se um aumento na diversidade microbiana, tendo sido identificados 371 géneros e 1041 espécies. Já no grupo de coelhos com abscesso dentário, verificou-se uma redução parcial da diversidade taxonómica, tendo sido identificados 357 géneros e 980 espécies.

Apesar da análise da diversidade alfa ter revelado uma redução estatisticamente significativa da diversidade microbiana nos coelhos com doença dentária e abscesso dentário, em comparação com os coelhos saudáveis. Esta diminuição indica uma perda de equilíbrio e resiliência do ecossistema oral a nível individual. Contudo, a diversidade taxonómica total (o número cumulativo dos grupos taxonómicos identificados em todo o grupo) foi superior nos coelhos com doença dentária e abscesso dentário em comparação com os saudáveis. Esta aparente contradição é explicada pela diversidade beta, que demonstrou que a composição

microbiana entre os indivíduos doentes era muito mais heterogênea. Deste modo, diferentes coelhos doentes desenvolveram perfis disbióticos distintos, com a proliferação de diversos grupos bacterianos oportunistas que variaram entre indivíduos, o que resultou num maior número total de grupos taxonômicos únicos quando considerados coletivamente.

Para além da diversidade taxonômica global, também foram observadas diferenças na abundância relativa dos principais filos e gêneros bacterianos presentes nos três grupos de animais em estudo. A nível de filos bacterianos, os coelhos saudáveis apresentaram um microbioma dominado por Pseudomonadota (73,59%), Bacteroidota (12,18%) e Bacillota (11,90%). Nos coelhos com doença dentária, verificou-se uma redução da abundância relativa de Pseudomonadota (52,72%), acompanhada por um aumento de Bacillota (23,46%) e Bacteroidota (16,90%). Além disso, Fusobacteriota aumentou para 5,69%. Nos coelhos com abscesso dentário, verificou-se um aumento ainda maior de Bacteroidota (21,54%) e Fusobacteriota (4,54%), enquanto a proporção de Pseudomonadota subiu novamente para 63,66%.

A redução progressiva do filo Pseudomonadota, bem como o aumento de Bacteroidota e Fusobacteriota, são concordantes com padrões inflamatórios previamente descritos (Griffen et al. 2012; Hall et al. 2022). Além disso, o aumento de Bacteroidota e Fusobacteriota tem sido associado a infeções odontogénicas em humanos (Siqueira e Rôças 2013), reforçando a relevância destas alterações na composição microbiana para o desenvolvimento de doença.

Ao nível dos gêneros bacterianos, verificou-se que *Bibersteinia* foi dominante nos coelhos saudáveis (20,25%), que a proporção de *Porphyromonas* aumentou substancialmente nos coelhos com doença dentária e abscesso dentário, e que a proporção de *Streptococcus* aumentou apenas nos casos de doença dentária, observando-se uma redução na sua abundância relativa nos coelhos com abscesso dentário em relação ao grupo de controlo. Nos coelhos saudáveis, os gêneros *Bibersteinia* e *Rodentibacter* foram os mais representativos. Nos coelhos com doença dentária, *Streptococcus* tornou-se dominante (16,21%), seguido de *Bibersteinia*, cuja abundância sofreu uma redução para 11,34%, e *Porphyromonas* (10,10%). Por sua vez, nos coelhos com abscesso dentário, *Bibersteinia* voltou a ser o género predominante (15,37%), acompanhado por *Porphyromonas* (7,60%), *Bacteroides* (6,86%) e *Rodentibacter* (6,59%), enquanto a proporção de *Streptococcus* sofreu uma redução drástica para apenas 2,51%.

O género *Bibersteinia* destacou-se como o género mais prevalente entre os coelhos saudáveis, seguido dos gêneros *Rodentibacter*, *Chryseobacterium*, *Avibacterium*, *Streptococcus* e *Pelistega*. Apesar de estes resultados não serem totalmente concordantes com o estudo de Flenghi et al (2023), no qual *Streptococcus*, *Rothia* e *Enterobacter* destacaram-se como alguns dos gêneros principais do microbioma oral de coelhos saudáveis,

existe alguma convergência entre os estudos relativamente à presença de *Streptococcus* e *Pelistega*. As discrepâncias podem estar relacionadas com a metodologia analítica (sequenciação 16S vs. cultura bacteriana) (Rhoads et al. 2012; Oxford Nanopore Technologies 2020b) e características da população estudada, como idade, ambiente e dieta dos coelhos (Flenghi et al. 2023).

Foi possível observar que a disbiose oral nos coelhos com doença dentária em estudo estava associada a um aumento na abundância relativa de *Streptococcus* nos animais com doença dentária, seguido de uma redução nos coelhos com abscesso dentário. Esta variação sugere que este género pode desempenhar um papel inicial na destabilização do microbioma oral, criando um ambiente propício para a subsequente colonização por anaeróbios obrigatórios, que se tornam predominantes à medida que a infeção progride. Embora este padrão seja semelhante ao observado em infeções periodontais humanas, nas quais a transição para um ambiente inflamatório favorece microrganismos anaeróbios (Hajishengallis e Lamont 2012; Siqueira e Rôças 2013), nos coelhos, a dentição de crescimento contínuo e a morfologia oral poderão influenciar a progressão da disbiose de forma distinta, tornando os processos inflamatórios potencialmente mais crónicos e frequentemente associados à formação de abscessos odontogénicos (Verstraete e Osofsky 2005).

A prevalência do género *Porphyromonas* aumentou nos grupos de coelhos doença dentária e com abscesso dentário relativamente aos coelhos saudáveis, que apresentaram uma abundância relativa de 0,61%. Esta variação sugere que *Porphyromonas* pode estar relacionada com a progressão das doenças orais em coelhos, o que está em conformidade com estudos anteriores que demonstraram a sua associação com infeções odontogénicas e abscessos maxilofaciais nesta espécie animal (Gardhouse et al. 2017). De facto, num estudo com base na análise da presença de agentes bacterianos em abscessos odontogénicos em coelhos, Gardhouse et al. (2017) identificaram *Porphyromonas* entre os anaeróbios isolados de infeções dentárias profundas.

A infeção por *Porphyromonas gingivalis* pode revelar-se impactante na homeostase oral e na progressão de doenças periodontais, uma vez que em humanos está associada a processos inflamatórios crónicos e induzir perda óssea alveolar significativa (Al-Bayaty et al. 2019).

A transição do microbioma oral para um perfil dominado por agentes anaeróbios obrigatórios, como é o caso de *Porphyromonas*, pode estar associada a uma modificação no ambiente inflamatório da cavidade oral. Um estudo realizado por Zenobia et al. (2014) demonstrou que *P. gingivalis* pode alterar significativamente a composição da microbiota oral, ao promover um aumento da carga bacteriana global e favorecer a instalação de comunidades disbióticas, o que, conseqüentemente, pode progredir para uma infeção odontogénica. Um

aspecto relevante do papel de *Porphyromonas* na patogénese das doenças dentárias em coelhos está relacionado com a sua capacidade de evasão da resposta imune do hospedeiro. *P. gingivalis* tem a capacidade de modular a resposta do sistema imunitário através da regulação de vias inflamatórias, nomeadamente através da modificação estrutural dos seus lipopolissacarídeos (LPS), e favorecer um ambiente inflamatório crónico (Bostanci e Belibasakis 2012).

Os resultados deste estudo, que identificou uma maior prevalência de *Porphyromonas* nos grupos de coelhos com doença dentária e abscesso dentário, reforçam a evidência do seu papel na evolução da doença oral nesta espécie. A sua presença em proporção elevada aponta para um estado avançado de disbiose oral, facilitando a transição para um perfil microbiano mais inflamatório e favorecendo o desenvolvimento de infeções crónicas encapsuladas, como os abscessos odontogénicos.

A presença mais abundante dos géneros *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Bacterioides*, e *Pasteurella* no grupo de coelhos com abscesso dentário sugere a existência de uma associação entre a presença destes microrganismos com a progressão da doença odontogénica. Estudos prévios demonstraram que as infeções odontogénicas em coelhos são frequentemente causadas por uma combinação de bactérias anaeróbias e aeróbias (Tyrrell et al. 2002; Benato 2017). De facto, o estudo de Gardhouse et al. (2017) demonstrou que a maioria dos abscessos odontogénicos em coelhos apresenta um elevado número de microrganismos anaeróbios obrigatórios, com *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp. e *Bacterioides* spp. a serem os géneros mais frequentemente isolados, enquanto *Pasteurella* spp., *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. se destacam entre os géneros aeróbios presentes. A predominância de *Fusobacterium* e *Bacterioides* em abscessos dentários sugere um ambiente hipóxico, propício ao crescimento de bactérias anaeróbias estritas, favorecido pela cápsula fibrosa característica destes abscessos (Benato 2017). Além disso, Gardhouse et al. (2017) identificaram *Pasteurella* como um dos géneros aeróbios mais frequentemente isolados a partir de abscessos odontogénicos de coelhos (19,2%), sendo um agente patogénico comum nesta espécie, associado a múltiplos abscessos subcutâneos, pulmonares, hepáticos, entre outros. Em relação ao género *Haemophilus*, apesar de não ser referido na bibliografia disponível sobre abscessos dentários em coelhos domésticos, foi já previamente associado a infeções respiratórias e sistémicas em porquinhos-da-índia e outros roedores (Graham e Knafp 2021).

Os resultados obtidos neste estudo apontam para uma possível associação entre a progressão da doença dentária e a uma redução na diversidade microbiana. Adicionalmente, a substituição de bactérias previamente associadas à homeostase oral, por microrganismos com propriedades inflamatórias, sugere que a disbiose microbiana pode ser um fator

determinante na patogénese da doença dentária e na formação de abscessos dentários. Estes resultados reforçaram a importância da análise da composição microbiana como um possível biomarcador de progressão da doença, destacando o potencial diagnóstico das alterações no microbioma oral para a deteção precoce de processos inflamatórios e infecciosos em coelhos com predisposição para doença dentária.

3.2. Identificação de biomarcadores microbianos

A análise LEfSe permitiu identificar biomarcadores microbianos distintivos dos três grupos de coelhos estudados, destacando os grupos taxonómicos representados de forma diferencial no microbioma oral saudável, na doença dentária e nos casos de abscessos dentários.

A identificação da presença das espécies *Chryseobacterium taklimakanense*, *Rodentibacter* sp., *Bibersteinia trehalosi*, *Pelistega ratti* e *Avibacterium paragallinarum* como biomarcadores do microbioma oral de coelhos saudáveis representa um resultado inovador, uma vez que não foi possível encontrar na literatura científica disponível até à data, informações sobre o seu papel na cavidade oral desta espécie animal.

Bibersteinia trehalosi é um microrganismo frequentemente descrito no contexto médico-veterinário, sendo conhecido por causar septicemia e pneumonia em ruminantes (Hanthorn et al. 2014; Brown et al. 2020; Han et al. 2021). Além disso, este género pode desenvolver interações competitivas com outros membros da família Pasteurellaceae, como *Mannheimia haemolytica*, através de mecanismos inibitórios dependentes de contacto (Dassanayake et al. 2010). No entanto, a ausência de informação relativa à sua participação na microbiota oral de coelhos, levantou questões sobre o seu possível papel na homeostase microbiana oral desta espécie animal.

Quanto às restantes espécies bacterianas identificadas, não foi possível encontrar descrições prévias relativas à sua presença na microbiota oral de coelhos, ou à sua eventual função na manutenção do equilíbrio microbiano. A escassez de dados reforça a necessidade de mais estudos para esclarecer se estes microrganismos fazem parte da microbiota residente do ecossistema oral, ou se a sua presença pode estar associada a fatores ambientais e fisiológicos ainda não caracterizados.

Neste estudo observou-se uma alteração na composição microbiana da cavidade oral de coelhos com doença dentária, com *Streptococcus ruminantium*, *Rodentibacter* sp. (espécie diferente da identificada nos animais saudáveis), *Leptotrichia* sp., *Rodentibacter haemolyticus* e *Veillonella* sp. a serem identificados como possíveis biomarcadores de doença dentária nestes animais.

Streptococcus ruminantium está descrito na literatura como agente etiológico de mastite em ovinos (Rosa et al. 2023), bem como de endocardite, artrite, pneumonia e abscessos em bovinos e ovinos (Okura et al. 2019; Gottschalk et al. 2020). Além disso, a sua presença em tonsilas de bovinos saudáveis sugere um potencial papel como comensal oportunista ou agente patogénico emergente, reforçando a necessidade de maior vigilância epidemiológica (Okura et al. 2019). Embora não haja relatos da sua presença em coelhos, a deteção em animais com doença dentária pode representar uma possível translocação ou adaptação a novos nichos orais, possivelmente facilitada por condições inflamatórias ou imunossupressoras.

O género *Veillonella* é amplamente reconhecido como um componente da microbiota oral humana, onde participa ativamente na formação de biofilmes dentários e estabelece interações simbióticas com *Streptococcus* spp. (Hughes et al. 1992; Lamont et al. 2018). Algumas espécies deste género têm sido implicadas na progressão da periodontite e de cáries dentárias, uma vez que utilizam o lactato produzido por estreptococos, influenciando a acidificação do meio oral e promovendo disbiose (Lamont et al. 2018). Em coelhos, o género *Veillonella* foi identificado em abscessos odontogénicos, mas o seu papel no microbioma oral e na progressão da doença dentária ainda não está completamente esclarecido (Gardhouse et al. 2017). A sua presença em infeções dentárias crónicas sugere que pode estar associado a alterações patológicas no microbioma oral desta espécie.

O género *Leptotrichia* foi encontrado em associação com doenças periodontais e abscessos orais, mais recentemente considerado como oportunista na cavidade oral em humanos. A sua presença foi documentada em biofilmes subgingivais e na microbiota de pacientes com periodontite (Eribe e Olsen 2017). Em coelhos, *L. dentium* foi associada a lesões ulcerativas após inoculação subcutânea, sugerindo um possível papel em infeções dentárias (Tamimi 1962).

Relativamente ao género *Rodentibacter*, não existem relatos disponíveis relativamente à sua associação com doenças dentárias em coelhos. No entanto, foi considerado um género oportunista, frequentemente presente na cavidade oral de ratos, apresentando variações significativas em termos de abundância consoante as condições ambientais (Cheng et al. 2021), estando muitas vezes associado a situações de periodontite nestes animais (Ai et al. 2022).

Nos coelhos com abscesso dentário, os principais biomarcadores identificados foram *Porphyromonas* spp., *Bacteroides* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Moraxella cuniculi* e *Tannerella forsythia*.

O género *Porphyromonas*, especialmente *P. gingivalis*, é considerado um agente patogénico periodontal humano, conhecido por promover a destruição tissular e a inflamação

crónica (Mulhall et al. 2020). No entanto, a presença de *Porphyromonas* em coelhos com abscesso dentário não se encontra amplamente confirmada, não tendo sido identificada em estudos baseados em cultura bacteriana de amostras deste tipo de infeções (Tyrrell et al. 2002), ou tendo sido identificada em quantidades reduzidas (Gardhouse et al. 2017). Assim, a sua relevância no microbioma oral do coelho permanece incerta e requer investigação adicional.

O género *Bacteroides* pode atuar como oportunista em infeções odontogénicas em humanos, e a sua presença nestas infeções destaca o seu potencial papel oportunista na formação de biofilmes inflamatórios (Dashper et al. 2017). Nos coelhos, este género foi identificado igualmente em abscessos odontogénicos, sugerindo que é capaz de se adaptar a um ambiente oral anaeróbio e participar na progressão da infeção (Gardhouse et al. 2017).

Fusobacterium nucleatum é uma espécie-chave na formação de biofilmes patogénicos, devido à sua capacidade de co-agregação com outras bactérias e indução de um ambiente inflamatório (Pignatelli 2023). Nos coelhos, *Fusobacterium* foi já identificado como um dos agentes anaeróbios mais comuns em abscessos dentários (Gardhouse et al. 2017), embora os mecanismos específicos de patogenicidade nesta espécie ainda não tenham sido completamente esclarecidos.

A espécie *Moraxella cuniculi* foi descrita pela primeira vez na mucosa oral de coelhos saudáveis, mas a sua relação com infeções odontogénicas permanece incerta (Flenghi et al. 2023). Ainda não foram realizados estudos com vista à caracterização da sua capacidade de virulência ou de envolvimento em infeções, representando uma lacuna na literatura científica.

Por fim, *Tannerella forsythia* é um dos principais agentes envolvidos na periodontite humana, frequentemente encontrado em associação com *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* (Sharma 2010). A sua presença em infeções odontogénicas de outras espécies, como cães, foi também documentada (Di Bello et al. 2014). Contudo, não há relatos da presença de *T. forsythia* na microbiota oral de coelhos, nem em animais desta espécie com abscessos odontogénicos (Tyrrell et al. 2002; Gardhouse et al. 2017). A sua possível participação na patogénese de infeções dentárias em coelhos permanece, assim, especulativa.

No geral, a microbiota associada aos abscessos dentários em coelhos apresenta semelhanças com a de outras espécies animais, sendo dominada por anaeróbios formadores de biofilmes, como *Fusobacterium* e *Bacteroides* (Gardhouse et al. 2017). No entanto, persistem lacunas significativas na literatura, sobretudo no que concerne ao papel de *Porphyromonas* spp., *Tannerella forsythia* e *Moraxella cuniculi*, cuja relevância na patogénese das infeções odontogénicas nesta espécie exige investigação adicional.

3.3. Implicações Clínicas

Os resultados deste estudo evidenciaram que as alterações no microbioma oral de coelhos com doença dentária e abscesso dentário, podem não ser apenas um reflexo da doença, mas estar diretamente envolvidas na sua progressão. Deste modo, a identificação de biomarcadores específicos para cada condição clínica, sugere que a análise do microbioma oral pode ser uma ferramenta valiosa para o diagnóstico precoce e monitorização da doença dentária em coelhos. Estudos em periodontite humana demonstraram, previamente, que perfis microbianos orais distintos podem permitir o estadiamento da doença e auxiliar na avaliação antecipada de sua progressão (Na et al. 2020), indicando um potencial semelhante em contexto médico-veterinário.

A utilização de abordagens baseadas em sequenciação do microbioma e análise de biomarcadores representa, assim, uma estratégia inovadora para a avaliação da saúde oral em lagomorfos, pois permite um diagnóstico menos invasivo e mais preciso em comparação com métodos clínicos tradicionais. Contudo, os custos ainda elevados destas técnicas restringem, por enquanto, a sua implementação sistemática na clínica de coelhos. Por exemplo, quando realizadas em paralelo à avaliação clínica convencional, a aplicação de técnicas moleculares para detetar bactérias indicadoras de doença melhora o diagnóstico de periodontite em cães (Wallis et al. 2024). Estudos de periodontite em humanos também já demonstraram o potencial destas técnicas, demonstrando que a sequenciação de nova geração permite caracterizar assinaturas microbianas específicas associadas à doença (Liu et al. 2012).

Os resultados desta dissertação também podem ter implicações diretas na escolha da terapêutica para tratamento da doença dentária em coelhos. A composição bacteriana dos abscessos dentários observada sugere a necessidade de ajustar a terapia antimicrobiana de acordo com os agentes patogénicos predominantes em cada caso (Gardhouse et al. 2017). Em particular, o aumento da abundância de *Fusobacterium*, *Porphyromonas* e *Bacteroides* em animais com abscessos dentários aponta para a escolha de antibióticos direcionada a bactérias anaeróbias. Estudos prévios em coelhos com abscessos odontogénicos demonstraram que a clindamicina (Tyrrell et al. 2002), apesar da sua utilização ser contraindicada devido à sua toxicidade nesta espécie (Carpenter e Harms 2023), é altamente eficaz contra anaeróbios estritos, enquanto o metronidazol apresenta eficácia significativa contra anaeróbios gram-negativos e cocos gram-positivos, mas é menos eficaz contra bastonetes gram-positivos e estreptococos anaeróbios (Tyrrell et al. 2002). Fluoroquinolonas, como a enrofloxacin, são potencialmente eficazes contra *Pasteurella* spp., enquanto *Streptococcus* spp. apresenta suscetibilidade à maioria dos antibióticos testados (Amoxicilina

com ácido clavulânico, ampicilina, cefazolina, enrofloxacina, cloranfenicol, entre outros), com exceção dos aminoglicosídeos. De facto, a caracterização microbiológica de amostras de abscessos odontogénicos em coelhos revelou a presença de uma variedade de organismos anaeróbios e aeróbios, pelo que a terapia empírica deve abranger ambos os espectros. A ênfase em antibióticos de amplo espectro com eficácia contra microrganismos anaeróbios justifica-se pelas altas taxas de isolamento de bactérias anaeróbias a partir destas lesões, enquanto antimicrobianos direcionados contra cocos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos (como *Pasteurella*) são importantes no controlo da infeção em estágios iniciais. No entanto, a seleção do tratamento deve ser guiada por testes de suscetibilidade (Gardhouse et al. 2017) e pelas particularidades dos lagomorfos relativamente ao uso de antibióticos (Capello 2008; Benato 2017; Carpenter e Harms, 2023).

Para além do uso de antibióticos, estratégias de modulação do microbioma podem representar uma nova abordagem terapêutica para prevenção e controlo das doenças dentárias em coelhos. O uso de probióticos orais, incluindo bactérias comensais benéficas, pode ajudar a restaurar o equilíbrio microbiano e a reduzir a colonização por agentes patogénicos, competindo com estes pelos nichos ecológicos e nutrientes presentes na cavidade oral. Um estudo realizado por Mehrani et al. (2023) demonstrou que a suplementação oral de coelhos com *Lactobacillus plantarum* pode contribuir para a regeneração do tecido periodontal, redução da inflamação e modulação da resposta imune, promovendo efeitos benéficos contra a doença periodontal. O mesmo foi demonstrado em ratos, nos quais a suplementação oral com *Lactobacillus acidophilus* reduz a inflamação periodontal e modula a resposta imune (Rodrigues et al. 2023).

Do ponto de vista clínico, o conjunto dos resultados obtidos neste estudo relativamente aos biomarcadores microbianos identificados, sugere que estes poderiam ser explorados como potenciais indicadores da progressão da doença dentária em coelhos, permitindo o desenvolvimento de estratégias de monitorização e intervenção precoce na saúde oral destes animais. Foi já demonstrado que, em medicina veterinária, a deteção precoce de alterações microbianas, aliada a medidas profiláticas, pode atrasar significativamente a progressão de doenças periodontais (Wallis et al. 2024). A validação destes biomarcadores em estudos futuros poderá, portanto, contribuir para uma abordagem mais precisa no diagnóstico e tratamento das doenças dentárias em lagomorfos, consolidando a relevância da microbiota oral na fisiopatologia destas condições. Ferramentas baseadas na identificação molecular de biomarcadores têm o potencial de melhorar as taxas de diagnóstico e a tomada de decisões clínicas, tal como demonstrado em modelos caninos de periodontite (Wallis et al. 2024). Em última análise, ao integrar perfis microbiológicos nos protocolos de avaliação clínica seria

possível, não apenas diagnosticar precocemente e estratificar o risco, mas também direcionar terapias com maior precisão, otimizando o manejo das doenças dentárias em coelhos.

Os dados obtidos neste estudo reforçam, igualmente, a necessidade de monitorização regular do microbioma oral em coelhos com predisposição para doenças dentárias. Frequentemente, a doença dentária em coelhos é subdiagnosticada, sendo apenas detetada quando atinge estágios avançados, uma vez que as alterações iniciais podem passar despercebidas ao exame clínico de rotina (Palma-Medel et al. 2023). Neste contexto, a implementação de exames microbiológicos periódicos pode permitir a deteção precoce de padrões de disbiose, possibilitando intervenções preventivas, antes que a doença progrida para estados irreversíveis ou de difícil manejo (Lenartova et al. 2021).

Além da monitorização microbiológica, estratégias de manejo alimentar e ambiental desempenham um papel crucial na prevenção da disbiose oral e das doenças dentárias associadas. Estudos previamente realizados indicaram que a dieta influencia diretamente a saúde oral dos coelhos, sendo que a disponibilidade de feno na alimentação promove um padrão de mastigação adequado e um desgaste constante dos dentes, enquanto a sua ausência está associada a maiores alterações dentárias e risco de doença (Palma-Medel et al. 2023). Paralelamente, a introdução de estratégias de enriquecimento ambiental contribui para a manutenção de uma microbiota oral equilibrada, estimulando comportamentos naturais de forrageamento e mastigação. Tais estratégias incluem esconder alimento fibroso em brinquedos interativos e dispor forragem em locais elevados do recinto, incentivando o movimento e promovendo um desgaste dentário mais homogêneo. Além disso, a disponibilização de materiais seguros para roer, como madeira não tratada, feno prensado ou túneis com palha, auxilia a manutenção do comprimento dentário adequado e reduz o risco de sobrecrescimento dentário (RSPCA Victoria 2023). Estas medidas de enriquecimento, combinadas com avaliações odontológicas regulares por um médico veterinário, são fundamentais para reduzir a incidência de maloclusões e, conseqüentemente, o risco de infeções secundárias. Evidências epidemiológicas mostram que coelhos mantidos em ambientes, que permitem maior liberdade de movimento e forrageio, aliados a uma dieta rica em feno, apresentam uma menor ocorrência de doença dentária (Palma-Medel et al. 2023). Em suma, a adoção de uma abordagem integrativa e preventiva — combinando monitorização microbiológica, otimização da dieta fibrosa, enriquecimento ambiental e acompanhamento odontológico periódico — constitui a base para uma abordagem preventiva e proativa na saúde oral de coelhos, melhorando o bem-estar destes animais e mitigando as complicações associadas às doenças dentárias.

3.4. Limitações do Estudo

Embora este estudo forneça informações úteis acerca da relação entre o microbioma oral e as doenças dentárias em coelhos, algumas limitações devem ser consideradas no momento da interpretação dos resultados.

O presente estudo incluiu 27 coelhos, distribuídos de igual forma entre os três grupos clínicos. Embora esta amostra permita identificar tendências na composição do microbioma oral, um número maior de indivíduos poderia reforçar a robustez estatística e minimizar variações individuais. Além disso, fatores como idade, dieta e genética podem influenciar a composição microbiana, sendo necessário expandir o número de amostras para avaliar o impacto dessas variáveis.

A análise foi realizada num único momento temporal, o que impossibilitou a avaliação da dinâmica da progressão da disbiose oral ao longo do tempo. Além disso, a inclusão de coelhos com doença dentária em diferentes estágios pode ter influenciado o microbioma oral observado, dificultando uma interpretação precisa das alterações microbianas. A realização de estudos longitudinais permitiria monitorizar mudanças na microbiota antes, durante e após o desenvolvimento da doença, fornecendo evidências mais claras sobre a relação entre mudanças microbianas e a progressão da doença.

A utilização de *long-read sequencing* (Oxford Nanopore) permitiu obter uma resolução taxonômica elevada, mas a precisão da identificação de algumas espécies pode ser influenciada por erros intrínsecos desta tecnologia. Além disso, a análise baseada na região do rRNA 16S tem limitações na diferenciação de espécies altamente semelhantes.

A microbiota oral pode ser influenciada por múltiplos fatores externos, como alimentação, interações sociais, historial clínico e exposição ambiental e a antibióticos. Muitos destes fatores variaram de amostra para amostra, o que pode ter afetado as diferenças observadas na diversidade microbiana.

4. Conclusão

O presente estudo mostra que a doença dentária em coelhos está associada a alterações significativas do microbioma oral. O microbioma dos coelhos afetados apresentou uma diminuição acentuada da diversidade alfa (riqueza de espécies), em comparação com os coelhos saudáveis, indicando um possível estado de disbiose oral. Concomitantemente, verificou-se uma alteração marcada na composição bacteriana, sendo que os géneros comensais predominantes nos animais saudáveis deram lugar a um microbioma dominado por bactérias patogénicas oportunistas nos animais com doença dentária. Igualmente, a análise da diversidade beta revelou perfis microbianos distintos entre os grupos, refletindo

uma clara separação na estrutura da comunidade conforme o estado de saúde oral dos animais. De um modo geral, estes resultados reforçam a ideia de que a presença de doença dentária e o desequilíbrio do microbioma oral estão intimamente relacionados, sugerindo inclusive que determinados grupos taxonómicos podem vir a servir de biomarcadores destas condições.

Do ponto de vista clínico, a identificação destas alterações microbianas abre perspectivas para novas abordagens diagnósticas e terapêuticas. A deteção precoce de um desequilíbrio caracterizado pelo sobrecrescimento de *Streptococcus* e *Porphyromonas*, por exemplo, poderá auxiliar no diagnóstico precoce da doença dentária, permitindo intervenções mais atempadas. Adicionalmente, a modulação dirigida do microbioma, seja através de probióticos específicos ou de outras estratégias que visem restaurar a diversidade perdida, surge como uma via promissora para o tratamento e prevenção destas doenças (Mehrani et al. 2023 Mar).

Importa também reconhecer algumas limitações deste estudo. O tamanho da amostra relativamente reduzido e a natureza transversal da análise limitam a generalização dos resultados, e a metodologia de sequenciação de 16S utilizada, acarreta restrições de resolução taxonómica e enviesamento na identificação de determinados grupos microbianos. Para além disso, variáveis não controladas, como diferenças na idade ou no ambiente dos animais, podem ter influenciado o microbioma oral, não sendo possível descartar completamente o seu impacto nos resultados. Para superar estas limitações e aprofundar o conhecimento alcançado, sugere-se a realização de estudos futuros com amostras de maior dimensão e desenho longitudinal, de modo a acompanhar a progressão da disbiose ao longo do tempo e esclarecer relações de causalidade. A integração de abordagens metagenómicas funcionais, como a *Whole-Genome Shotgun Sequencing* (WGS) ou o perfil funcional preditivo a partir de dados 16S recorrendo a ferramentas como PICRUSt2 ou Tax4Fun2, permitirá investigar não só quais os microrganismos presentes, mas também as funções metabólicas que desempenham, elucidando os mecanismos pelos quais o desequilíbrio microbiano contribui para a patogénese dentária. Por fim, ensaios clínicos com terapias direcionadas ao microbioma, como a administração de probióticos específicos ou a modulação controlada da comunidade oral, poderão avaliar o potencial de restaurar a eubiose oral e, assim, prevenir ou tratar de forma mais eficaz as doenças dentárias no coelho.

5. Referências Bibliográficas

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. 2005. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 43(11):5721–5732. doi:10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005.
- Ai R, Li D, Shi L, Zhang X, Ding Z, Zhu Y, He Y. 2022. Periodontitis induced by orthodontic wire ligature drives oral microflora dysbiosis and aggravates alveolar bone loss in an improved murine model. *Front Microbiol.* 13. <https://imagej>.
- Al-Bayaty F, Ibrahim O, Kutty M, Harun F, Selamat S, Adam M, Jamil M. 2019. *Porphyromonas gingivalis* Induces Alveolar Bone Loss and Brain Lesions in Rabbit. *Journal of International Dental and Medical Research.* 12(2):389–395.
- Al-Cafes M, Tuygunov M, Usmanova I, Pavlovna L, Raminovich I, Azat U. 2017. Evaluation of the state of some oral obligate anaerobic and opportunistic microflora by periodontal inflammatory diseases. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 9(10):1720–1724. <https://www.researchgate.net/publication/321679706>.
- Arzi B, Staszuk C. 2019. The Temporomandibular Joint Through the Lens of Comparative Anatomy. In: Connely ST, editor. *Contemporary Management of Temporomandibular Disorders.* 1st ed. Cham: Springer International Publishing. p. 41–50.
- Avila M, Ojcius DM, Zlem Yilmaz O. 2009. The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest. *DNA Cell Biol.* 28(8):405–411. www.liebertpub.com.
- Badger JH, Ng PC, Venter JC. 2011. The Human Genome, Microbiomes, and Disease. In: Nelson K, editor. *Metagenomics of the Human Body.* 1st ed. Nova Iorque: Springer Science+Business Media. p. 1–14.
- Di Bello A, Buonavoglia A, Franchini D, Valastro C, Ventrella G, Greco MF, Corrente M. 2014. Periodontal disease associated with red complex bacteria in dogs. *Journal of Small Animal Practice.* 55(3):160–163. doi:10.1111/jsap.12179.
- Benato L. 2017. Odontogenic abscesses in pet rabbits. *Veterinary Record.* 181(20):536–537. doi:10.1136/vr.j5249.
- Berger ME. 2023. Dental diseases in rabbits: malocclusion and their consequences [Dissertação]. [Budapest]: University of Veterinary Medicine Budapest.
- Bik EM, Long CD, Armitage GC, Loomer P, Emerson J, Mongodin EF, Nelson KE, Gill SR, Fraser-Liggett CM, Relman DA. 2010. Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME Journal.* 4(8):962–974. doi:10.1038/ismej.2010.30.
- Böhmer C, Böhmer E. 2017. Shape variation in the craniomandibular system and prevalence of dental problems in domestic rabbits: A case study in evolutionary veterinary science. *Vet Sci.* 4(1):1–25. doi:10.3390/vetsci4010005.
- Böhmer E. 2015. *Dentistry in Rabbits and Rodents.* 1st ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Borawski W, Kielbowicz Z, Kubiak-Nowak D, Prządka P, Pasternak G. 2024. Computed Tomographic Findings of Dental Disease and Secondary Diseases of the Head Area in Client-Owned Domestic Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): 90 Cases. *Animals.* 14(8):1–15. doi:10.3390/ani14081160.
- Bostanci N, Belibasakis GN. 2012. *Porphyromonas gingivalis*: An invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett.* 333(1):1–9. doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02579.x.
- Böttger S, Zechel-Gran S, Schmermund D, Streckbein P, Wilbrand JF, Knitschke M, Pons-Kühnemann J, Hain T, Weigel M, Imirzalioglu C, et al. 2021. Clinical relevance of the microbiome in odontogenic abscesses. *Biology (Basel).* 10(9):1–14. doi:10.3390/biology10090916.
- Brown SE, Bycroft KA, Adam K, Collett MG. 2020 Jul 9. Acute fibrinous pleuropneumonia and septicaemia caused by *Bibersteinia trehalosi* in neonatal calves in New Zealand. *N Z Vet J.*:51–57. doi:10.1080/00480169.2020.1792372.

- Capello V. 2004. Diagnosis and Treatment of Dental Disease in Pet Rabbits and Rodents: A Review. *AEMV Newsletter*. 2(2):5–12.
- Capello V, Gracis M. 2005. *Rabbit and rodent dentistry handbook*. 1st ed. Lake Worth (FL): Zoological Education Network. 276 p.
- Capello V. 2006. The Dental Suite: Equipment Needed for Handling Small Exotic Mammals. *J Exot Pet Med*. 15(2):106–115. doi:10.1053/j.jepm.2006.02.006.
- Capello V. 2008. Clinical Technique: Treatment of Periapical Infections in Pet Rabbits and Rodents. *J Exot Pet Med*. 17(2):124–131. doi:10.1053/j.jepm.2008.03.009.
- Capello V. 2016. Intraoral Treatment of Dental Disease in Pet Rabbits. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*. 19(3):783–798. doi:10.1016/j.cvex.2016.05.002.
- Carpenter J, Harms C. 2023. *Carpenter's Exotic Animal Formulary*. 6th ed. St. Louis: Elsevier.
- Cheng X, Guo X, Huang F, Lei H, Zhou Q, Song C. 2021. Effect of different sweeteners on the oral microbiota and immune system of Sprague Dawley rats. *AMB Express*. 11(1). doi:10.1186/s13568-020-01171-8.
- Crossley DA. 2003. Oral biology and disorders of lagomorphs. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*. 6(3):629–659. doi:10.1016/S1094-9194(03)00034-3.
- Cunha E, Valente S, Nascimento M, Pereira M, Tavares L, Dias R, Oliveira M. 2021. Influence of the dental topical application of a nisin-biogel in the oral microbiome of dogs: A pilot study. *PeerJ*. 9. doi:10.7717/peerj.11626.
- Dashper SG, Nastri A, Abbott P V. 2017. Odontogenic Bacterial Infections. In: Farah CS, Balasubramaniam RJ, McCullough MJ, editors. *Contemporary Oral Medicine*. Cham: Springer International Publishing. p. 1–53.
- Dassanayake RP, Call DR, Sawant AA, Carol Casavant N, Weiser GC, Knowles DP, Srikumaran S. 2010. *Bibersteinia trehalosi* Inhibits the growth of *Mannheimia haemolytica* by a proximity-dependent mechanism. *Appl Environ Microbiol*. 76(4):1008–1013. doi:10.1128/AEM.02086-09.
- Deo P, Deshmukh R. 2019. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 23(1):122–128. doi:10.4103/jomfp.JOMFP_304_18.
- Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. 2010. The human oral microbiome. *J Bacteriol*. 192(19):5002–5017. doi:10.1128/JB.00542-10.
- Dewhirst FE, Klein EA, Bennett ML, Croft JM, Harris SJ, Marshall-Jones Z V. 2015. The feline oral microbiome: A provisional 16S rRNA gene based taxonomy with full-length reference sequences. *Vet Microbiol*. 175(2–4):294–303. doi:10.1016/j.vetmic.2014.11.019.
- Dewhirst FE, Klein EA, Thompson EC, Blanton JM, Chen T, Milella L, Buckley CMF, Davis IJ, Bennett ML, Marshall-Jones Z V. 2012. The canine oral microbiome. *PLoS One*. 7(4). doi:10.1371/journal.pone.0036067.
- Donnelly TM, Vella D. 2016. Anatomy, Physiology and Non-dental Disorders of the Mouth of Pet Rabbits. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*. 19(3):737–756. doi:10.1016/j.cvex.2016.04.004.
- Edgar JL, Mullan SM. 2011. Knowledge and attitudes of 52 UK pet rabbit owners at the point of sale. *Veterinary Record*. 168(13):353. doi:10.1136/vr.c6191.
- Eribe ERK, Olsen I. 2017. *Leptotrichia* species in human infections II. *J Oral Microbiol*. 9. doi:10.1080/20002297.2017.1368848.
- Filoche S, Wong L, Sissons CH. 2010. Oral biofilms: Emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res*. 89(1):8–18. doi:10.1177/0022034509351812.
- Flenghi L, Mazouffre M, Le Loc'h A, Le Loc'h G, Bulliot C. 2023. Normal bacterial flora of the oral cavity in healthy pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Med Sci*. 9(4):1621–1626. doi:10.1002/vms3.1144.
- Fortun-lamothe L, Boullier S. 2004. Interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity, and strategies to improve digestive health in young rabbits. In: 8th World Rabbit Congress. Puebla: World Rabbit Science Association (WRSA). p. 1035–1058.

- Gao L, Xu T, Huang G, Jiang S, Gu Y, Chen F. 2018. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Protein Cell*. 9(5):488–500. doi:10.1007/s13238-018-0548-1.
- Gardhouse S, Sanchez-Migallon Guzman D, Paul-Murphy J, Byrne BA, Hawkins MG. 2017. Bacterial isolates and antimicrobial susceptibilities from odontogenic abscesses in rabbits: 48 cases. *Veterinary Record*. 181(20):1–7. doi:10.1136/vr.103996.
- Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. 2016. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 17(6):333–351. doi:10.1038/nrg.2016.49.
- Gottschalk M, Lacouture S, Fecteau G, Desrochers A, Boa A, Saab M, Okura M. 2020. Isolation of *Streptococcus ruminantium* (*Streptococcus suis*-like) from diseased ruminants in Canada. *Canadian Veterinary Journal*. 61(5):473–475.
- Graham J, Knafp SE. 2021. Infectious Disease Management in Animal Shelters. In: Miller Lila, Janeczko Stephanie, Hurley Kate, editors. *Infectious Disease Management in Animal Shelters*. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons. p. 562–579.
- Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, Podar M, Leys EJ. 2012. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME Journal*. 6(6):1176–1185. doi:10.1038/ismej.2011.191.
- Hajishengallis G, Lamont RJ. 2012. Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*. 27(6):409–419. doi:10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x.
- Hall MW, Wellappuli NC, Huang RC, Wu K, Lam DK, Glogauer M, Beiko RG, Senadheera DB. 2022 Aug 25. A search for “perio-probiotics” by longitudinal dissection of oral bacterial community shifts during the onset and resolution of gingivitis. *BioRxiv preprint*.:1–28. doi:10.1101/2022.08.25.505302. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.08.25.505302>.
- Han MN, Byeon HS, Chae MH, Jang RH, Na KJ. 2021. Sudden death of cattle caused by *Bibersteinia trehalosi* infection in Korea. *Journal of Veterinary Clinics*. 38(5):254–259. doi:10.17555/JVC.2021.38.5.254.
- Hanthorn CJ, Dewell RD, Cooper VL, Frana TS, Plummer PJ, Wang C, Dewell GA. 2014. Randomized clinical trial to evaluate the pathogenicity of *Bibersteinia trehalosi* in respiratory disease among calves. *BMC Vet Res*. 10. doi:10.1186/1746-6148-10-89.
- Harcourt-Brown F. 2009. Dental disease in pet rabbits 1. Normal dentition, pathogenesis and aetiology. *In Pract*. 31(8):370–379. doi:10.1136/inpract.31.8.370.
- Harcourt-Brown F. 2006. *Metabolic Bone Disease as a Possible Cause of Dental Disease in Pet Rabbits [Dissertação de Doutorado]*. [Bristol]: University of Bristol.
- Harcourt-Brown F. 2007. The Progressive Syndrome of Acquired Dental Disease in Rabbits. *J Exot Pet Med*. 16(3):146–157. doi:10.1053/j.jepm.2007.06.003.
- Harcourt-Brown F, Chitty J. 2013. *BSAVA manual of rabbit imaging, surgery and dentistry*. 1st ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Harvey ND, Oxley JA, Miguel-Pacheco G, Gosling EM, Farnworth M. 2019. What makes a rabbit cute? Preference for rabbit faces differs according to skull morphology and demographic factors. *Animals*. 9(10):1–21. doi:10.3390/ani9100728.
- Hu X, Wang F, Yang S, Yuan X, Yang T, Zhou Y, Li Y. 2021. Rabbit microbiota across the whole body revealed by 16S rRNA gene amplicon sequencing. *BMC Microbiol*. 21(1):1–6. doi:10.1186/s12866-021-02377-x.
- Hughes C V, Andersen RN, Kolenbrander PE. 1992. Characterization of *Veillonella atypica* PK1910 Adhesin-Mediated Coaggregation with Oral *Streptococcus* spp. *Infect Immun*. 60(3):1178–1186. <https://journals.asm.org/journal/iai>.
- Jackson MA, Burn CC, Hedley J, Brodbelt DC, O'Neill DG. 2024. Dental disease in companion rabbits under UK primary veterinary care: Frequency and risk factors. *Veterinary Record*. 194(6):no. doi:10.1002/vetr.3993.
- Jekl V, Redrobe S. 2013. Rabbit dental disease and calcium metabolism - the science behind divided opinions. *Journal of Small Animal Practice*. 54(9):481–490. doi:10.1111/jsap.12124.

- Jenkinson HF, Lamont RJ. 2005. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol.* 13(12):589–595. doi:10.1016/j.tim.2005.09.006.
- Kilian M, Chapple ILC, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, Tonetti MS, Wade WG, Zaura E. 2016. The oral microbiome - An update for oral healthcare professionals. *Br Dent J.* 221(10):657–666. doi:10.1038/sj.bdj.2016.865.
- Kolenbrander PE, London J. 1993. Adhere Today, Here Tomorrow: Oral Bacterial Adherence. *J Bacteriol.* 175(11):3247–3252. <https://journals.asm.org/journal/jb>.
- Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. 2018. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 16(12):745–759. doi:10.1038/s41579-018-0089-x.
- Lenartova M, Tesinska B, Janatova T, Hrebicek O, Mysak J, Janata J, Najmanova L. 2021. The Oral Microbiome in Periodontal Health. *Front Cell Infect Microbiol.* 11. doi:10.3389/fcimb.2021.629723.
- Lennox A. 2008a. Brief Overview of Dental Disease in Pet Rabbits. *Clinician's Brief.* 6(2):52–62. www.cliniciansbrief.com.
- Lennox A. 2008b. Diagnosis and Treatment of Dental Disease in Pet Rabbits. *J Exot Pet Med.* 17(2):107–113. doi:10.1053/j.jepm.2008.03.008.
- Levy I, Mans C. 2024. Diagnosis and outcome of odontogenic abscesses in client-owned rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): 72 cases (2011–2022). *J Am Vet Med Assoc.* 262(5):658–664. doi:10.2460/javma.23.12.0718.
- Liu B, Faller LL, Klitgord N, Mazumdar V, Ghodsi M, Sommer DD, Gibbons TR, Treangen TJ, Chang YC, Li S, et al. 2012. Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease. *PLoS One.* 7(6). doi:10.1371/journal.pone.0037919.
- Martins H, Milne JA, Rego F. 2002. Seasonal and spatial variation in the diet of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Portugal. *J Zool.* 258(3):395–404. doi:10.1017/S0952836902001541.
- McCracken T, Kainer R. 2008. *Color Atlas of Small Animal Anatomy: The Essentials.* 1st ed. Ames.
- McLaren MR, Willis AD, Callahan BJ. 2019. Consistent and correctable bias in metagenomic sequencing experiments. *eLife.* 8:e46923. doi:10.7554/eLife.46923.
- McLean JS. 2014. Advancements toward a systems level understanding of the human oral microbiome. *Front Cell Infect Microbiol.* 4(98):1–13. doi:10.3389/fcimb.2014.00098.
- Mehrani Y, Kazemi Mehrjerdi H, Tavakoli A, Shafieian R, Salari A. 2023 Mar. Effects of Probiotic *Lactobacilli plantarum* in Treatment of Experimentally Induced Periodontal Disease in Rabbits. *J Vet Dent.*:1–7. doi:10.1177/08987564231163193.
- Meredith A, Lord B. 2014. *BSAVA Manual of Rabbit Medicine.* Meredith A, Lord B, editors. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association (BSAVA).
- Michaeli Y, Hirschfeld Z, Weinreb M. 1980. The cheek teeth of the rabbit: morphology, histology and development. *Acta Anat (Basel).* 106(2):223–239. doi:10.1159/000145185.
- Mulhall H, Huck O, Amar S. 2020. *Porphyromonas gingivalis*, a long-range pathogen: Systemic impact and therapeutic implications. *Microorganisms.* 8(6):1–15. doi:10.3390/microorganisms8060869.
- Müller J, Clauss M, Codron D, Schulz E, Hummel J, Fortelius M, Kircher P, Hatt JM. 2014. Growth and wear of incisor and cheek teeth in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) fed diets of different abrasiveness. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* 321(5):283–298. doi:10.1002/jez.1864.
- Na HS, Kim SY, Han H, Kim HJ, Lee JY, Lee JH, Chung J. 2020. Identification of potential oral microbial biomarkers for the diagnosis of periodontitis. *J Clin Med.* 9(5):1–17. doi:10.3390/jcm9051549.
- Nascimento D. 2021. Estudo tomográfico das alterações ósseas e dentárias na doença dentária dos coelhos de estimação (*Oryctolagus cuniculus*) – Estudo retrospectivo [Dissertação de Mestrado]. [Lisboa]: Universidade de Lisboa.
- Nieuw Amerongen A V., Veerman ECI. 2002. Saliva - The defender of the oral cavity. *Oral Dis.* 8(1):12–22. doi:10.1034/j.1601-0825.2002.1o816.x.

- Okura M, Maruyama F, Ota A, Tanaka T, Matoba Y, Osawa A, Sadaat SM, Osaki M, Toyoda A, Ogura Y, et al. 2019. Genotypic diversity of *Streptococcus suis* and the *S. suis*-like bacterium *Streptococcus ruminantium* in ruminants. *Vet Res.* 50(1). doi:10.1186/s13567-019-0708-1.
- O'Neill DG, Craven HC, Brodbelt DC, Church DB, Hedley J. 2019. Morbidity and mortality of domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) under primary veterinary care in England. *Veterinary Record.* 185(14):441. doi:10.1136/vetrec-2019-105592. <https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions>.
- Oxford Nanopore Technologies. 2018. Advantages of nanopore sequencing in microbiome research. Oxford.
- Oxford Nanopore Technologies. 2019. Advantages of Long Reads for Genome Assembly. Oxford.
- Oxford Nanopore Technologies. 2020a. Addressing the challenges of metagenomics. Oxford.
- Oxford Nanopore Technologies. 2020b. Large insights into microorganisms MICROBIOLOGY B. Oxford.
- Palma-Medel T, Marcone D, Alegría-Morán R. 2023. Dental Disease in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and Its Risk Factors—A Private Practice Study in the Metropolitan Region of Chile. *Animals.* 13(4):1–10. doi:10.3390/ani13040676.
- Parahitiyawa NB, Scully C, Leung WK, Yam WC, Jin LJ, Samaranayake LP. 2010. Exploring the oral bacterial flora: Current status and future directions. *Oral Dis.* 16(2):136–145. doi:10.1111/j.1601-0825.2009.01607.x.
- Pfeifer SP. 2017. From next-generation resequencing reads to a high-quality variant data set. *Heredity (Edinb).* 118(2):111–124. doi:10.1038/hdy.2016.102.
- Radaic A, Kapila YL. 2021. The oralome and its dysbiosis: New insights into oral microbiome-host interactions. *Comput Struct Biotechnol J.* 19:1335–1360. doi:10.1016/j.csbj.2021.02.010.
- Rajendhran J, Gunasekaran P. 2010. Human microbiomics. *Indian J Microbiol.* 50(1):109–112. doi:10.1007/s12088-010-0034-9.
- Rhoads DD, Wolcott RD, Sun Y, Dowd SE. 2012. Comparison of culture and molecular identification of bacteria in chronic wounds. *Int J Mol Sci.* 13(3):2535–2550. doi:10.3390/ijms13032535.
- Rodrigues C, Rosa ACR, Pasqualotto LF, Pandini JH, Leite MA, Brancalhão RMC, Amorim JPA, Nassar LM, Nassar CA, Nassar PO. 2023. Effect of probiotic therapy on periodontal tissues and intestinal mucosa of rats with ligature-induced periodontitis. *ABCS Health Sciences.* 48. doi:10.7322/abcshs.2021073.1810.
- Rosa MN, Vezina B, Marogna G, Canu A, Molotzu MR, Tola S. 2023. *Streptococcus ruminantium*-associated sheep mastitis outbreak detected in Italy is distinct from bovine isolates. *Vet Res.* 54(1). doi:10.1186/s13567-023-01248-9.
- RSPCA Victoria. 2023. Enrichment and handling for rabbits [Internet]. Burwood East (AU): RSPCA Victoria; [acedido em 2025 Fev 1]. Disponível em: <https://rspcavic.org/learn/enrichment-and-handling-for-rabbits/>
- Ruby J, Goldner M. 2007. Nature of Symbiosis in Oral Disease. *J Dent Res.* 86(1):8–11.
- Sampaio-Maia B, Caldas IM, Pereira ML, Pérez-Mongiovi D, Araujo R. 2016. The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases. In: Laskin A, Sariaslani S, Gadd G, editors. *Advances in Applied Microbiology.* Vol. 97. 1st ed. Academic Press Inc. p. 171–210.
- Schwab M, Brockmann M, Stumpf P, Pfabe J, Müller E, Pees M, Marschang RE. 2024. Isolation of aerobic bacteria from abscesses and wounds in rabbits and antibiotic susceptibility testing of *Staphylococcus* spp. and *Pseudomonas* spp. isolates. *J Exot Pet Med.* 49:41–47. doi:10.1053/j.jepm.2024.03.009.
- Sharma A. 2010. Virulence Mechanisms of *Tannerella forsythia*. *Periodontol 2000.* 54(1):106–116. doi:10.1111/j.1600-0757.2009.00332.x.

- Siqueira JF, Rôças IN. 2013. Microbiology and treatment of acute apical abscesses. *Clin Microbiol Rev.* 26(2):255–273. doi:10.1128/CMR.00082-12.
- Socransky SS, Haffajee AD. 1992. The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts. *J Periodontol.* 63(4):322–331.
- Tamimi H. 1962. Isolation, Growth Requirements, and Pathogenicity for Rabbits of *Leptotrichia dentium*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 109(4):828–830.
- Taylor M, Beaufrère H, Mans C, Smith D. 2010. Long-term outcome of treatment of dental abscesses with a wound-packing technique in pet rabbits: 13 cases (1998–2007). *J Am Vet Med Assoc.* 237(12):1444–1449.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. 2007. The Human Microbiome Project. *Nature.* 449(7164):804–810. doi:10.1038/nature06244.
- Tyrrell KL, Citron DM, Jenkins JR, Goldstein EJC, Quesenberry K, Aiken S, Canny C, Hess L, Nye R, Ellis C, et al. 2002. Periodontal bacteria in rabbit mandibular and maxillary abscesses. *J Clin Microbiol.* 40(3):1044–1047. doi:10.1128/JCM.40.3.1044-1047.2002.
- Vecere G, Malka S, Holden N, Tang S, Krumbeck JA. 2022. Comparison of ear canal microbiome in rabbits (*Oryctolagus cuniculus domesticus*) with and without otitis externa using next generation DNA sequencing. *J Exot Pet Med.* 42:35–41. doi:10.1053/j.jepm.2022.05.002.
- Velasco-Galilea M, Piles M, Viñas M, Rafel O, González-Rodríguez O, Guivernau M, Sánchez JP. 2018. Rabbit Microbiota Changes Throughout the Intestinal Tract. *Front Microbiol.* 9:1–13. doi:10.3389/fmicb.2018.02144.
- Vella D. 2012. Emergency Presentations of Exotic Mammal Herbivores. *J Exot Pet Med.* 21(4):293–299. doi:10.1053/j.jepm.2012.09.005.
- Verstraete FJM, Osofsky A. 2005. Dentistry in Pet Rabbits. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian.* 27(9):671–684.
- Wallis C, Marshall M, Colyer A, O’Flynn C, Deusch O, Harris S. 2015. A longitudinal assessment of changes in bacterial community composition associated with the development of periodontal disease in dogs. *Vet Microbiol.* 181(3–4):271–282. doi:10.1016/j.vetmic.2015.09.003.
- Wallis C V., Soltero-Rivera M, Harvey C, Reynolds RM, Carvell-Miller LJ, Colyer A, McKee TS, Mills T, Bergman PJ, Watson P, et al. 2024. Real-world diagnostic potential of bacterial biomarkers of canine periodontitis. *Front Vet Sci.* 11:1–14. doi:10.3389/fvets.2024.1377119.
- Wang Yunhao, Zhao Y, Bollas A, Wang Yuru, Au KF. 2021. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat Biotechnol.* 39(11):1348–1365. doi:10.1038/s41587-021-01108-x.
- Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS. 2012. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Dis.* 18(2):109–120. doi:10.1111/j.1601-0825.2011.01851.x.
- Zaura E, Keijsers BJ, Huse SM, Crielaard W. 2009. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* 9. doi:10.1186/1471-2180-9-259.
- Zenobia C, Hasturk H, Nguyen D, Van Dyke TE, Kantarci A, Darveau RP. 2014. *Porphyromonas gingivalis* lipid a phosphatase activity is critical for colonization and increasing the commensal load in the rabbit ligature model. *Infect Immun.* 82(2):650–659. doi:10.1128/IAI.01136-13.

6. Anexos

Anexo 1. Consentimento Informado



Projeto de Dissertação de Mestrado

Avaliação do Microbioma Oral em Coelho Com e Sem Doença Dentária

Consentimento Informado

Eu, abaixo assinado, portador do Cartão de Cidadão/ Bilhete de Identidade/ Passaporte _____ declaro que autorizo Francisco Serra e Sousa Almeida, estudante estagiário no Hospital Escolar Veterinário FMV-ULisboa, a realizar colheita de amostras por zaragatoa oral ao meu coelho _____, no âmbito do Projeto de Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária "Avaliação do Microbioma Oral em Coelho Com e Sem Doença Dentária".

A doença oral e os abscessos são dos problemas mais comuns em coelhos devido ao crescimento contínuo de seus dentes. Infecções bacterianas, dentes desalinhados e o seu crescimento excessivo ou mesmo traumatismos podem resultar em dores e complicações orais.

A sintomatologia associada à doença oral e aos abscessos é representada principalmente por: falta de apetite, dificuldade em comer, salivação excessiva e zonas da mucosa oral inchadas com possível secreção de pus. Ao notar que um ou mais destes sinais está presente, é de extrema importância que recorra a apoio médico-veterinário assim que possível, pois, na sua ausência, o prognóstico desta doença torna-se grave. Conhecer os agentes envolvidos nesta doença é fundamental para diagnosticar, tratar e prevenir eficazmente estas infeções, de forma a contribuir para a saúde e o bem-estar destes animais.

Declaro que fui informado, verbalmente e por escrito, sobre as condições em que se realiza este projeto e que a colheita de amostras pelos métodos acima apresentados é gratuita.

Ao abrigo da Lei da Proteção de Dados Pessoais (Lei nº68/98), das orientações de conduta e utilização de animais não humanos e das Diretrizes da União Europeia (Diretiva 2010/63/EU) relativas à proteção de animais usados para propósitos científicos, autorizo a utilização dos dados, exames clínicos e componentes digitais do respetivo animal para elaboração de dissertações de mestrado integrado, teses de doutoramento ou estudos científicos.

Lisboa, ___ de _____ de 202_

O(A) Tutor(a)

Anexo 2. Inquérito Epidemiológico Realizado aos Tutores



Projeto de Dissertação de Mestrado

“Avaliação do Microbioma Oral em Coelho Com e Sem Doença Dentária”

Inquérito aos Tutores

Os seus dados pessoais são confidenciais e de uso exclusivo para este estudo

Preenchimento por escrito ou por entrevista

I. Dados Relativos ao Tutor

Nome: _____
Idade: _____
NºCC/BI/Passaporte: _____

II. Dados Relativos ao Animal de Companhia

<p>Nome: _____</p> <p>Idade: _____</p> <p>Raça: _____</p> <p>Peso: _____</p> <p>Sexo:</p> <p><input type="checkbox"/> Macho</p> <p><input type="checkbox"/> Fêmea</p> <p>Alojamento:</p> <p><input type="checkbox"/> Gaiola</p> <p><input type="checkbox"/> Parque</p> <p><input type="checkbox"/> Outro: _____</p> <p>Acesso ao exterior:</p> <p><input type="checkbox"/> Sim</p> <p><input type="checkbox"/> Não</p>	<p>Alimentação</p> <p>Ração:</p> <p><input type="checkbox"/> Não</p> <p><input type="checkbox"/> Sim</p> <p>Qual? _____</p> <p>Feno:</p> <p><input type="checkbox"/> Não</p> <p><input type="checkbox"/> Sim</p> <p>Qual? _____</p> <p>Extras: _____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>
<p>Histórico de procedimentos dentários?</p> <p><input type="checkbox"/> Não</p> <p><input type="checkbox"/> Sim</p> <p>Quando? _____</p> <p>Histórico de doença dentária?</p> <p><input type="checkbox"/> Não</p> <p><input type="checkbox"/> Sim</p>	<p>Histórico de abcesso dentário?</p> <p><input type="checkbox"/> Não</p> <p><input type="checkbox"/> Sim</p> <p>Quando? _____</p> <p>Tratamento em curso?</p> <p><input type="checkbox"/> Não</p> <p><input type="checkbox"/> Sim</p> <p>Qual? _____</p>

<p>Histórico de toma de antibióticos?</p> <p><input type="checkbox"/> Não</p> <p><input type="checkbox"/> Sim</p> <p>Quando? _____</p> <p>_____</p> <p>Qual? _____</p> <p>_____</p> <p>Motivo? _____</p> <p>_____</p>	<p>Histórico prévio de doenças:</p> <p>Doença ocular?</p> <p><input type="checkbox"/> Não</p> <p><input type="checkbox"/> Sim</p> <p>Qual? _____</p> <p>_____</p> <p>Quando? _____</p> <p>_____</p> <p>Doença respiratória?</p> <p><input type="checkbox"/> Não</p> <p><input type="checkbox"/> Sim</p> <p>Qual? _____</p> <p>_____</p> <p>Quando? _____</p> <p>_____</p> <p>Outras: _____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>
--	---

Anexo 3. Resultados do Inquérito Epidemiológico

ID Animal	Idade	Raça	Género	Peso (Kg)	Alojamento	Acesso Exterior	Ração	Feno
1	8m	Anão	F	1	livre	S	P	S
2	7a	Lop	F	2	parque	S	P	S
3	6a	Lop	M	2	parque	S	P	S
4	4a	Anão	M	1.4	livre	N	P	S
5	1a	Anão	F	1.91	livre	O	P	S
6	3a	Lion Head	M	2.3	parque	N	P	S
7	3a	Lion Head	M	1.635	parque	S	P	S
8	3a	Lion Head	F	1.825	parque	S	P	S
9	3,5a	Lion Head	M	1.43	gaiola	S	M	N
10	8a	Angorá	F	1.365	gaiola	S	P	S
11	11a	Anão	M	1	parque	S	M	N
12	3a	Belier	M	1.84	livre	N	P	N
13	4a	Belier	F	1.99	parque	N	P	S
14	4a	Belier	M	1.96	livre	N	P	S
15	5a	Anão	M	1.47	livre	N	M	N
16	3a	Angorá	F	1.245	gaiola	N	P	S
17	8a	Anão	F	1.31	gaiola	S	M	N
18	5a	Belier	M	1.465	gaiola	N	M	N
19	4,2a	Belier	F	2.42	livre	N	M	N
20	5,5a	Belier	M	1.79	livre	N	M	S
21	1a	Lion Head	F	1.42	livre	N	M	S
22	2.3a	Anão	M	1.54	livre	N	P	S
23	4a	Belier	M	1.8	gaiola	N	P	S
24	10a	Anão	F	1.7	livre	N	P	N
25	3a	Anão	M	1.11	gaiola	S	P	S
26	4a	Anão	F	1.4	exterior	S		
27	4a	Belier	M	1.9	livre	S	P	S

Legenda ID: identificação; a: anos; m: meses; F: fêmea; M: macho; S: sim; N: não; P: pellets; M: muesli.

ID Animal	Extras	Historial Procedimento Dentário	Número Procedimentos Dentários	Historial Doença Dentária
1	Pão, cascas de fruta e legumes, coentros e salsa	N	0	N
2	Aveia, suplem. p/ articulações	N	0	N
3	Aveia, suplem. p/ articulações	N	0	N
4	Biscoitos naturais, rúcula e agrião	N	0	N
5	Aipo, coentros, salsa, manjeriço e rúcula	N	0	N
6	Cenoura, bróculos, couve, banana	N	0	N
7	Legumes verdes e frutas	N	0	N
8	Legumes verdes e frutas	N	0	N
9	Legumes e frutas	N	0	N
10	Vegetais, beterraba, pimentos, cenoura, fruta	S	>1	S
11		S	>1	S
12	Legumes e frutas	S	1	S
13	Couve-flor, cenoura, coentros, maçã, banana, frutos vermelhos	S	1	S
14		S	>1	S
15	Banana, maçã, cenoura	N	0	S
16		S	1	S
17	Coentros, salsa, bróculos, fruta	S	>1	S
18		S	>1	S
19	Cenoura, couve, fruta desidratada, maçã, pêra	N	0	N
20	Couve, bróculos, espinafres, nabiça, maçã, morangos, cenoura	N	0	N
21	Maçã e banana	N	0	N
22	Banana, rúcula, manjeriço	S	>1	S
23		S	>1	S
24		S	>1	S
25	Legumes e frutas	S	>1	S
26		N	0	N
27	Rúcula, espinafres, salsa, agrião, maçã, ananás	S	>1	S

Legenda. ID: identificação; S: sim; N: não.

ID Animal	Historial Abscessos Dentários	Tratamento Recente ou em Curso	Historial Antibioterapia	Historial Doença Ocular	Historial Doença Respiratória
1	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	N
5	N	N	N	N	N
6	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N
8	N	N	N	N	N
9	N	Sulfametoxazol + Trimetropim (há 15 dias)	N	N	N
10	N	Meloxicam e tramadol	Tobramicina ocular (12/23), Enrofloxacina (07/23), Azitromicina (05/23)	S	N
11	S	N	Amicacina (11/2023), doxiciclina e metronidazol (antes da amicacina)	S	S
12	N	N	Enrofloxacina (1/02/2024)	S	N
13	N	Crotax auricular há 1 semana, meloxicam	N	N	N
14	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N
16	N	Telmisartan	Enrofloxacina (parou há 3 semanas)	N	N
17	N	N	Azitromicina (parou 8/03)	S	S
18	N	N	Enrofloxacina (08/2023)	S	N
19	N	Penicilina há 3 dias	N	N	N
20	S	N	Enrofloxacina (24/01 a 7/02)	N	N
21	N	N	Enrofloxacina (16/03 a 25/03) e Injetáveis de penicilina (22/03 e 25/03)	N	N
22	S	Penicilina há 1 dia	Penicilina (10/23) e Azitromicina (09/23)	N	N
23	N	N	Enrofloxacina (há 1 ano)	S	N
24	S	N	Enro (ano passado)	N	N
25	S	N	Enrofloxacina (12/23)	N	N
26	N	Penicilina há 12h, metadona	N	N	N
27	S	N	Enrofloxacina (01/23 a 03/23) e Amoxicilina + Ác Clavulânico (12/2023)	N	N

Legenda. ID: identificação; S: sim; N: não.