



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

Natália Amanda Gomes

**Expressão de proteínas derivadas da matriz do esmalte em
ratos com periodontite experimentalmente induzida**

**Araçatuba – SP
2023**

Natália Amanda Gomes

**Expressão de proteínas derivadas da matriz do esmalte em
ratos com periodontite experimentalmente induzida**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, para a obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Periodontia.

Orientadora: Profa. Assoc. Dra. Letícia Helena Theodoro

Coorientador: Prof. Assoc. Dr. Edilson Ervolino

**Araçatuba – SP
2023**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

G633e Gomes, Natália Amanda.
Expressão de proteínas derivadas da matriz do
esmalte em ratos com periodontite experimentalmente
induzida / Natália Amanda Gomes. – Araçatuba, 2023
51 f. : il.; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Letícia Helena Theodoro
Coorientador: Prof. Edilson Ervolino

1. Esmalte dentário 2. Periodontite 3. Inflamação
4. Engenharia tecidual 5. Amelogenina I.T.

Black D6
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedico esta dissertação aos meus queridos pais, *Andréia e Juliano*, meus maiores incentivadores. A vocês dedico mais do que este título e o presente trabalho, dedico e compartilho todas as conquistas e vitórias da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus* e à *São Miguel de Arcanjo*, guias do meu destino por concederem-se esta oportunidade e por enviarem pessoas maravilhosas neste período do mestrado. Por serem fonte inesgotável de fé e amparo em todas as horas. Foi um desafio conciliar tudo e fazer o melhor. Sou grata a tudo que sou e a tudo que me tornei.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, instituição na qual tive o privilégio de dar continuidade a minha jornada acadêmica. Agradeço ao diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, *Glauco Issamu Miyahara* e ao vice-diretor *Alberto Carlos Botazzo Delbem*, ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Odontologia *Wirley Gonçalves Assunção* e a vice- coordenadora *Roberta Okamoto*.

Aos meus queridos pais, *Andréia* e *Juliano*, meus maiores incentivadores. Exemplos de caráter, honestidade e bondade na vida. Não existem palavras que expressem todo o zelo, suporte, confiança e condições que me permitissem realizar este sonho. Aliás, realizamos este sonho juntos. Por dedicarem-se à minha educação. Como herança, o ensinamento e exemplo de que as grandes conquistas são alcançadas por meio de muito trabalho, determinação, seriedade e resiliência.

Aos meus familiares, pelo constante incentivo, apoio e torcida. Especialmente aos meus queridos avós *Roseni*, *Orlando*, *Márcia* e *Davi* por todas as orações e momentos inigualáveis que pude viver ao lado de vocês até hoje. Por estarem presentes em cada conquista e por me ajudarem a levantar após cada tropeço.

Nunca esqueceremos de onde viemos, e muito menos para onde vamos. Mas de nossa jornada, o que realmente importa são as referências que levamos para vida. As pessoas que te inspiram. Que te ensinam a ter coragem. Que te fazem ver além. Tive a sorte de encontrar o Prof. Dr. *João Paulo Steffens*, no meio do meu caminho. Responsável pelo meu ingresso e trajetória no universo acadêmico e da ciência. Por ser sem sombra de dúvidas meu maior ídolo dentro da Periodontia. E hoje a única coisa que eu posso fazer é AGRADECER.

A minha orientadora, Profa. Dra *Letícia Helena Theodoro* pela sua incalculável contribuição na idealização do presente trabalho. Minha eterna gratidão pela

confiança depositada, por todo conhecimento transmitido e compartilhado. Minha sincera admiração e respeito pela figura que é e pela profissional competente, entusiasta e íntegra que todos reverenciam.

Ao meu coorientador, Prof. Assoc. Edilson Ervolino simplesmente não existem palavras para descrever minha gratidão por todo o suporte e dedicação para que este trabalho fosse realizado. Por ser autor de um caminho brilhante e honrável, mantendo-se cercado de uma humildade admirável. Ser um grande exemplo de dedicação e perseverança. Por contribuir tanto em minha formação acadêmica e pessoal, compartilhando sabedoria e amizade.

Ao corpo docente da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, mas especialmente aos professores: Valdir Gouveia Garcia, Rafael Scaf de Molon, Luciano Cintra, Eloi Dezam e Leonardo Faverani, pelo gratificante convívio e pelos inúmeros momentos de aprendizagem. São grandes exemplos para mim e para nossa comunidade científica.

Às minhas queridas amigas Lícia Clara Belizário, Mariana Paglisi Justo e Jamila Natália Maziero por resgatarem meu sorriso, esperança, coragem, diante dos inúmeros obstáculos vividos neste período. Por fazerem de mim não apenas mais uma pessoa no mundo e sim a pessoa que representa o mundo para vocês.

Às minhas queridas amigas do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Paraná: Giovana, Thaís C, Thaís S, Caroline, Kariana, Helena nas quais carrego em minha vida para sempre. Que apesar da distância devido às diferentes escolhas profissionais que fizemos, fazem-se leais e presentes.

À nossa equipe de trabalho, especialmente ao meu amigo Tiago Esgalha da Rocha, que mesmo apesar da distância não mediu esforços para contribuir não apenas neste trabalho, mas nas demais pesquisas desenvolvidas pelo grupo. Meu sincero agradecimento pela nossa amizade, pelo companheirismo nos momentos mais difíceis e pela alegria compartilhada nas horas de sucesso. Ao João Paulo Franciscon, João Victor Soares, Eduardo Q. M de Souza, como também aos colegas de especialização em endodontia da FOA pelo incentivo, dedicação, comprometimento, supervisão durante a execução deste trabalho, mas especialmente pela troca de experiências.

Agradeço a todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP. Especialmente aos funcionários do Centro de Assistência Odontológica à Pessoa com Deficiência (CAOE), Ana Damaceno e Ricardo Pezzoti por serem verdadeiros “anjos de luz”. Por todo o suporte e prontidão ofertada nos mais diversos contratempos no decorrer deste curso. Carinho, respeito e gratidão. Às funcionárias da seção de Pós-Graduação e da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Valéria de Queiroz M. Zagatto, Cristiane Regina Lui Matos, e Ana Claudia M. Grieger Manzatti pelo excelente trabalho, atenção dispensada, grande disposição em atender e ótimo relacionamento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela concessão de Bolsa de Mestrado (CAPES-DS; 01/04/2021 – 01/03/2022) e à Rede de Pesquisa Internacional do Programa CAPES *PRINT* (processo nº. 88887.571136/2020-00).

Aos laboratórios de pesquisa da *Faculty of Dentistry, University of Toronto*, especialmente aos pesquisadores: Dr. Aiman Ali, Prof. Bernhard Gans e Prof. Marco Magalhaes.

Por fim, meu profundo respeito aos animais desta pesquisa, como um dos grandes pilares para o desenvolvimento da ciência.

*“Os homens nascem macios e elásticos
mortos eles são rígidos e duros.
As plantas nascem terrenas e flexíveis;
mortas são secas e frágeis.
Assim, quem for rígido e inflexível,
é um discípulo da morte.
Quem for gentil e flexível,
é um discípulo da vida.
O duro e rígido será quebrado.
O suave e flexível irá
prevalecer.”*

(Lao Tzu)

GOMES, N. A. **Expressão de proteínas derivadas da matriz do esmalte em ratos com periodontite experimentalmente induzida**. 2023. 51 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

A junção dentogengival consiste na adaptação da mucosa oral envolvendo o epitélio oral (EO), epitélio sulcular (ES), epitélio juncional (EJ) e tecido conjuntivo. O EJ desempenha um papel crucial, promovendo aderência à superfície dentária. Além disso, em condições de saúde secreta inúmeras moléculas como mecanismo de defesa para a eliminação de toxinas e para conter o desafio microbiano. No entanto, a destruição de sua integridade estrutural é considerada o marco na conversão do epitélio juncional em epitélio de bolsa e, por sua vez no desenvolvimento da periodontite. Desta forma, poucos são os estudos que visaram compreender quais as alterações desencadeadas aos diferentes níveis de expressão de marcadores inflamatórios e sua associação a proteínas derivadas da matriz do esmalte em periodontite experimental (PE). Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão da amelotina (AMTN), laminina (LAM-332) e a proteína secretada por células dendríticas foliculares (FDC-SP) no EJ sob a presença ou ausência de PE em ratos. Dezesesseis ratos foram aleatoriamente distribuídos em 2 grupos (n=8/grupo): Grupo Controle-Saúde - sem indução de periodontite experimental; Grupo Periodontite (PE) - indução de periodontite experimental. A indução da PE foi estabelecida por meio da colocação da ligadura de algodão ao redor da região cervical dos primeiros molares inferiores esquerdos. Quinze dias após a indução da PE todos os animais foram eutanasiados. Após a dissecação as hemi-mandíbulas esquerdas foram desmineralizadas e submetidas ao processamento histológico convencional, e as secções foram coradas pela hematoxilina-eosina (HE) para análise histopatológica dos tecidos periodontais e adjacentes, análise histométrica da perda óssea alveolar (POA) da região de furca e de perda óssea interproximal (POI) ou destinaram-se a reação imunohistoquímica para detecção e quantificação da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e imuno-histoquímicas fluorescentes para avaliação de AMTN, LAM-332, FDC-SP, CD45+ CD66b+, CD8, CD163 e CD80. Os dados foram

analisados estatisticamente com nível de significância de 5%. O grupo PE apresentou aumento na POA e POI, maior quantidade de células TRAP-positivas e focos de inflamação aos 15 dias de PE em relação ao grupo Controle-Saudável ($p < 0.05$). A expressão de AMTN aumentou significativamente no período de 15 dias para o grupo PE ($p < 0.05$), no entanto, não houve diferenças significativas entre a expressão de FDC-SP e LAM-332. A análise de correlação de AMTN, LAM-332 e FDC-SP com a intensidade de expressões dos marcadores de superfície inflamatória não exibiram diferenças significativas para o grupo PE. Conclui-se que, a expressão da amelotina pode estar associada à presença da periodontite em ratos com periodontite experimental.

Palavras-chave: Proteína Derivada da Matriz do Esmalte. Periodontite. Inflamação. Engenharia Tecidual. Amelogenina.

GOMES, N. A. **Expression of enamel matrix derived proteins in rats with experimentally-induced periodontitis**. 2023. 51 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

The dentogingival junction consists of the adaptation of the oral mucosa involving the oral epithelium (OE), sulcular epithelium (SE), junctional epithelium (JE) and connective tissue. The JE plays a crucial role, promoting adhesion to the tooth surface. In addition, under health conditions, molecules are secreted as a defense mechanism for the elimination of toxins and to contain the microbial challenge. However, the destruction of its structural integrity is considered the conversion of the junctional epithelium into pocket epithelium and, in turn, in the development of periodontitis. Thus, there are few studies that aimed to understand which changes are triggered by the different levels of expression of inflammatory markers and their association with proteins derived from the enamel matrix in experimental periodontitis (EP). Therefore, the aim of this study was to evaluate the expression of amelotin (AMTN), laminin (LAM-332) and the protein secreted by follicular dendritic cells (FDC-SP) in the JE under the presence or absence of PE in rats. Sixteen rats were randomly distributed into 2 groups (n=8/group): Control-Health Group - without experimental periodontitis induction; Periodontitis Group (PE) - induction of experimental periodontitis. PE induction was established by placing a cotton bandage around the cervical region of the lower left first molars. Fifteen days after PE induction, all animals were euthanized. After dissection, the left hemi-mandibles were demineralized and submitted to conventional histological processing, and the sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) for histopathological analysis of periodontal and adjacent tissues, histometric analysis of alveolar bone loss (ABL) in the region of furca and interproximal bone loss (ABLI) or were destined to immunohistochemical reaction for detection and quantification of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and fluorescent immunohistochemistry for evaluation of AMTN, LAM-332, FDC-SP, CD45+ CD66b+, CD8, CD163 and CD80. Data were statistically analyzed with a significance level of 5%. The PE group showed an increase in POA and POI, a greater amount of TRAP-positive cells and foci of inflammation at 15 days of PE compared to the Healthy-Control group ($p<0.05$). AMTN expression significantly increased within 15 days for the PE group ($p<0.05$), however,

there were no significant differences between FDC-SP and LAM-332 expression. Correlation analysis of AMTN, LAM-332 and FDC-SP with the intensity of expression of inflammatory surface markers did not show significant differences for the PE group. It is concluded that the expression of amelotin may be associated with the presence of periodontitis in rats with experimental periodontitis.

Keywords: Enamel Matrix Derived Protein. Periodontitis. Inflammation. Tissue Engineering. Amelogenin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Fotomicrografias do primeiro molar inferior esquerdo evidenciando a magnitude da resposta inflamatória local e o nível de perda óssea em região de furca (**c e f**) e interproximal (**a e d**) nos grupos Controle-Saúde (**a, b, c**) e PE (**d, e, f**) aos 15 dias. **Abreviações e símbolos:** *, infiltrado inflamatório; **oa**, osso alveolar; **ce**, cimento; **lp**, ligamento periodontal; **tc**, tecido conjuntivo; **tcsa**, tecido conjuntivo supra-alveolar. Aumento original: 100x. **Barras de escala:** 500 μ m e 100 μ m. **Coloração:** Hematoxilina e Eosina (H&E). 45

FIGURA 2 **a)** Gráfico indicando média e desvio padrão da perda óssea alveolar POA (mm^2), na região de furca nos diferentes grupos experimentais para o período de 15 dias. **b)** Gráfico indicando média e desvio padrão da medida linear expressa em (mm), na região interproximal **Abreviaturas e símbolos:** *, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PE, no mesmo período. * $p < 0,05$ 46

FIGURA 3 **A)** Gráfico indicando média e desvio padrão de imunomarcção de células TRAP-positivas da área de furca e interproximal para nos grupos Controle-Saúde (**a**) e PE (**b**) aos 15 dias, $p < 0,05$, teste *Shapiro Wilk*. **B)** Fotomicrografias evidenciando padrão de imunomarcção de células TRAP-positivas na região de furca (**b, c**) e interproximal (**d, e**) para os grupos Controle-Saúde (**b, d**) e PE (**c, e**). **Abreviaturas e símbolos:** **ab**, osso alveolar; **setas**, células imunomarcadas. **Contracoloração:** Hematoxilina de Harris. **Ampliação original:** 1000x. **Barras de escala:** 30 μ m. 47

FIGURA 4 Fotomicrografias evidenciando a intensidade de imunomarcção fluorescente de Amelotina (AMTN) no grupo Controle-Saúde (**A**) e PE (**B**). 1-2: Núcleos de AMTN contrastados por DAPI (contraste - verde-água). 3: Apenas AMTN corada na região de epitélio juncional (EJ) e epitélio oral (EO). **Setas vermelhas** demonstram que nenhuma imunocoloração de AMTN foi observada no epitélio juncional para no grupo Controle-Saúde. **Setas amarelas** demonstram um aumento de imunocoloração de AMTN para o grupo PE. (**1A, 1B**). **Abreviaturas e símbolos:** **Linha tracejada em amarelo** delimitação da região do epitélio juncional (EJ) Junção-Cimento-Esmalte seta vermelha (1A). **Contracoloração:** Verde de Metila. **Barras de escala:** 100 μ m. 48

FIGURA 5 Fotomicrografias evidenciando a intensidade de imunomarcacão fluorescente da proteína secretada por células dendríticas foliculares (FDC-SP) no grupo Controle-Saúde **(A)** e PE **(B)**. 1-2: Núcleos de FDC-SP contrastado por DAPI (contraste - verde-água). 3: Apenas FDC-SP corada na região de epitélio juncional (EJ) e epitélio oral (EO). **Setas vermelhas** demonstram que nenhuma imunocoloração de FDC-SP foi observada no epitélio juncional para o grupo Controle-Saúde. **Setas amarelas** demonstram um aumento de imunocoloração de FDC-SP para o grupo PE. **(1A, 1B)**. **Abreviaturas e símbolos:** Linha tracejada em amarelo delimitação da região do epitélio juncional (EJ) Junção-Cimento-Esmalte seta vermelha (1A). **Contracoloração:** Verde de Metila. **Barras de escala:** 100 μ m.

FIGURA 6 **a)** Gráfico do nível de expressão de AMTN nos grupos Controle-Saúde (a) e PE (b) aos 15 dias em intensidade de pixel. **b)** Gráfico do nível de expressão de FDC-SP nos grupos Controle-Saúde (a) e PE (b) aos 15 dias em intensidade de pixel. **c)** Gráfico do nível de expressão de LAM-332 nos grupos Controle-Saúde (a) e PE (b) aos 15 dias em intensidade de pixel. **Abreviaturas e símbolos:** *, diferença estatisticamente significativa com o grupo controle-saúde ($p < 0,05$; teste t Student)

50

FIGURA 7 Gráficos dos marcadores de superfície inflamatória **a)** CD163; **b)** CD66B; **c)** CD80; **d)** CD8; **e)** CD45; **f)** CD4, de acordo com a localização e presença de inflamação no grupos Controle-Saúde e PE. **Abreviaturas e símbolos:** *, diferença estatisticamente significativa com o grupo Controle-Saúde ($p < 0,05$; teste t Student).

51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica dos tecidos periodontais na região de furca região e na região interproximal do primeiro molar inferior nos diferentes grupos experimentais 40

LISTA DE ABREVIATURAS

% = Porcentagem

< = Menor

> = Maior

± = Mais ou menos

≤ = Menor ou igual

°C = Graus Celsius

µg/Kg = Microgramas por quilograma

µg/ml = Microgramas por mililitro

µl = Microlitros

µm = Micrômetros

AM = Amazonas, Brasil

ANOVA= Análise de Variância

CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais

cm² = Centímetros quadrados

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético

EJ = Epitélio Juncional

EO = Epitélio Oral

ES = Epitélio Sucular

EUA = Estados Unidos da América

FOA = Faculdade de Odontologia de Araçatuba

g = Gramas

HE = Hematoxilina-eosina

JCE = Junção-Cimento-Esmalte

IL-1β = Interleucina-1β

IL-6 = Interleucina-6

IL-17 = Interleucina-17

mg/Kg = Miligramas por quilograma

ml = Mililitros

mm = Milímetros

mm² = Milímetros quadrados

Nº = Número

PBS = Tampão fosfato salino

PE = Periodontite experimental

pH = Potencial hidrogeniônico

PMNs = leucócitos polimorfonucleares

POA = Perda óssea alveolar

SP= São Paulo, Brasil

tc = Tecido conjuntivo

TNF- α = Fator de necrose tumoral- α

to = Tecido ósseo

TRAP= Fosfatase ácida resistente ao tartarato

vs = Vasos sanguíneos

x = Vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1 Delineamento experimental	21
2.2 Indução da Periodontite Experimental	21
2.3 Processamento Histológico	21
2.4 Análise Histopatológica	22
2.5 Análise Histométrica	23
2.6 Processamento e análise Imunohistoquímica para células TRAP-positivas	24
2.7 Análise imunohistoquímica para células TRAP-positivas	25
2.8 Análise Imunohistoquímica Fluorescente	25
2.9 Análise Estatística	26
3 RESULTADOS	27
3.1 Análise Histopatológica	28
3.2 Análise Histométrica	28
3.3 Análise Imunohistoquímica – células TRAP-positivas	28
3.4 Análise da Intensidade Imunofluorescente em Pixel das proteínas	28
3.4.1 Análise de correlação dos Marcadores de Superfície Inflamatória (CD66B, CD80, CD163, CD45, CD8 e CD4) e a expressão de intensidade de fluorescência de AMTN, LAM-332 e FDC-SP	29
4 DISCUSSÃO	30
5 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	37
TABELAS	40
FIGURAS	42
ANEXOS	51

Manuscrito para publicação

EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DERIVADAS DA MATRIZ DO ESMALTE EM RATOS COM PERIODONTITE EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA

Gomes NA¹, Ervolino E², Ganss B³, Aiman A³, Theodoro LH¹.

¹Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia – FOA/UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba, SP, Brasil.

²Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia – FOA/UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba, SP, Brasil.

³Faculty of Dentistry, University of Toronto, Toronto, Canadá

Autor correspondente:

Leticia Helena Theodoro.

Endereço: Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP. Rua José Bonifácio, 1193, Centro. CEP: 16015-050, Araçatuba, SP, Brasil.

Telefone: (55) 18 – 36362860.

E-mail: leticia.theodoro@unesp.br (autorizado para publicação)

Palavras-chave: Periodontite, Modelo Animal, Engenharia Tecidual, Amelogenina.

REFERÊNCIAS

1. Lang NP, Bartold PM. Periodontal Health. *J Periodontol*. 2018; 89 Supl 1:S9-S16.
2. Bosshardt DD, Lang NP. The junctional epithelium: from health to disease. *J Dent Res*. 2005; 84: 9–20.
3. Schroeder HE. Ultrastructure of the junctional epithelium of the human gingiva. *Helv Odontol Acta*. 1969; 13: 65–83.
4. Noguchi S, Ukai T, Kuramoto A, et al. The histopathological comparison on the destruction of the periodontal tissue between normal junctional epithelium and long junctional epithelium. *J Periodontal Res*. 2017; 52: 74-82.
5. Fischer NG, Aparicio C. Junctional epithelium and hemidesmosomes: tape and rivets for solving the "percutaneous device dilemma" in dental and other permanent implants. *Bioact Mater*. 2022; 18: 178-198.
6. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018; 89: 159–172.
7. Yilmaz M, Demir E, Firatli Y, Firatli E, Gürsoy UK. Tissue levels of CD80, CD163 and CD206 and their ratios in periodontal and peri-implant health and disease. *Curr Issues Mol Biol*. 2022; 44: 4704-4713.
8. Fageeh HI, Fageeh HN, Patil S. Monocyte differentiation into destructive macrophages on in vitro administration of gingival crevicular fluid from periodontitis patients. *J Pers Med*. 2021; 11:555.
9. Hayes RB, Ahn J, Fan X, Peters BA, Ma Y, Yang L, Agalliu I, Burk RD, Ganly I, Purdue MP, Freedman ND, Gapstur SM, Pei Z. Association of Oral Microbiome With Risk for Incident Head and Neck Squamous Cell Cancer. *JAMA Oncol*. 2018 Mar 1;4(3):358-365. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.4777.
10. Mahanonda R, Champaiboon C, Subbalekha K, et al. Memory T cell subsets in healthy gingiva and periodontitis tissues. *J Periodontol*. 2018; 89: 1121-1130.

11. Lakschevitz FS, Hassanpour S, Rubin A, Fine N, Sun C, Glogauer M. Identification of neutrophil surface marker changes in health and inflammation using high-throughput screening flow cytometry. *Exp Cell Res*. 2016; 342: 200-209.
12. Clark D, Radaic A, Kapila Y. Mechanisms of inflammaging and periodontal disease. *Front Dent Med*. 2022; 3: 844865.
13. Iwasaki K, Bajenova E, Somogyi-ganss E, et al. Amelotin-a novel secreted, ameloblast-specific protein. *J Dent Res*. 2005; 84: 1127–1132.
14. Moffatt P, Smith CE, St-Arnaud R, Simmons D, Wright JT, Nanci A. Cloning of rat amelotin and localization of the protein to the basal lamina of maturation stage ameloblasts and junctional epithelium. *Biochem J*. 2006; 399: 37–46.
15. Ikeda Y, Neshatian M, Holcroft J, Ganss B. The enamel protein ODAM promotes mineralization in a collagen matrix. *Connect Tissue Res*. 2018; 59: 62-66.
16. Li C, Gao Y, Xu Z, et al. Expression and localization of amelotin, laminin $\gamma 2$ and odontogenesis-associated phosphoprotein (ODAPH) on the basal lamina and junctional epithelium. *J Mol Histol*. 2022; 53: 111-118.
17. Ahmed MG, Abouauf EA, Abubakr N, Dorfer CE, Els-sayed KF. Tissue engineering approaches for enamel, dentin, and pulp regeneration: an update. *Cells Int*. 2020; 2020: 5734539.
18. Nishio C, Wazen R, Kuroda S, Moffatt P, Nanci A. Expression pattern of odontogenic ameloblast-associated and amelotin during formation and regeneration of the junctional epithelium. *Eur Cell Mater*. 2010; 20: 393–402.
19. Marshall AJ, Du Q, Draves KE, Shikishima Y, HayGlass KT, Clark EA. FDC-SP, a novel secreted protein expressed by follicular dendritic cells. *J Immunol*. 2002; 169: 2381–2389.
20. Takahashi S, Fukuda M, Mitani A, et al. Follicular dendritic cell-secreted protein is decreased in experimental periodontitis concurrently with the increase of interleukin-17 expression and the Rankl/Opg mRNA ratio. *J Periodontal Res*. 2014; 49: 390-397.
21. Kinumatsu T, Hashimoto S, Muramatsu T, et al. Involvement of laminin and integrins in adhesion and migration of junctional epithelium cells. *J Periodontal Res*. 2009; 44: 13–20.

22. Nakayama Y, Takai H, Matsui S, et al. Proinflammatory cytokines induce amelotin transcription in human gingival fibroblasts. *J Oral Sci.* 2014; 56: 261–268.
23. Nakayama Y, Kobayashi R, Matsui S, et al. Localization and expression pattern of amelotin, odontogenic ameloblast-associated protein and follicular dendritic cell-secreted protein in the junctional epithelium of inflamed gingiva. *Odontology.* 2017; 105: 329-337.
24. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2020; 18: e3000410.
25. Ervolino E, Statkiewicz C, Toro LF, et al. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. *Bone.* 2019; 120: 101-113.
26. Garcia VG, Miessi DMJ, Esgalha da Rocha T, et al. The effects of *Lactobacillus reuteri* on the inflammation and periodontal tissue repair in rats: a pilot study. *Saudi Dent J.* 2022; 34: 516-526.
27. Miessi DMJ, Garcia VG, Ervolino E, et al. *Lactobacillus reuteri* associated with scaling and root planing in the treatment of periodontitis in rats submitted to chemotherapy. *Arch Oral Biol.* 2020; 117: 104825.
28. Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, et al. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2014; 49: 584-594.
29. Gomes NA, Guarenghi GG, Valenga HM, Warnavin SVSC, Chaves JDP, Cardoso AC, Steffens JP. Mandibular-related bone metabolism in orchietomized rats treated with sex hormones. *Arch Oral Biol.* 2021; 122: 105000.
30. Costes SV, Daelemans D, Cho EH, Dobbin Z, Pavlakis G, Lockett S. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J.* 2004; 86: 3993-4003.

31. Ali A, Soares AB, Eymael D, Magalhaes M. Expression of invadopodia markers can identify oral lesions with a high risk of malignant transformation. *J Pathol Clin Res*. 2021; 7: 61-74.
32. Eke PI, Thornton-Evans GO, Wei L, Borgnakke WS, Dye BA, Genco RJ. Periodontitis in US Adults: National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2014. *J Am Dent Assoc*. 2018 Jul;149(7):576-588.e6. doi: 10.1016/j.adaj.2018.04.023.
33. Hajishengallis G, Li X, Divaris K, Chavakis T. Maladaptive trained immunity and clonal hematopoiesis as potential mechanistic links between periodontitis and inflammatory comorbidities. *Periodontol* 2000. 2022 Jun;89(1):215-230. doi: 10.1111/prd.12421.
34. Oshiro A, Iseki S, Miyauchi M, Terashima T, Kawaguchi Y, Ikeda Y, Shinomura T. Lipopolysaccharide induces rapid loss of follicular dendritic cell-secreted protein in the junctional epithelium. *J Periodontal Res*. 2012 Dec;47(6):689-94. doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01482.x.
35. Genco CA, Van Dyke T, Amar S. Animal models for *Porphyromonas gingivalis*-mediated periodontal disease. *Trends Microbiol*. 1998; 6:444-449.
36. Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2008; 35: 89- 105.
37. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):134-44. doi: 10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x.
38. de Molon RS, Park CH, Jin Q, Sugai J, Cirelli JA. Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microsc Res Tech*. 2018 Dec;81(12):1412-1421. doi: 10.1002/jemt.23101.
39. Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2004 Apr;39(2):101-6. doi: 10.1111/j.1600-0765.2004.00710.x.

40. Fouillen A, Grenier D, Barbeau J, Baron C, Moffatt P, Nanci A. Selective bacterial degradation of the extracellular matrix attaching the gingiva to the tooth. *Eur J Oral Sci.* 2019; 127: 313-322.
41. Bartlett JD, Simmer JP. New perspectives on amelotin and amelogenesis. *J Dent Res.* 2015; 94:642-4.
42. Nouri S, Holcroft J, Caruso LL, Vuong TV, Simmons CA, Master ER, Ganss B. An SCPPPQ1/LAM332 protein complex enhances the adhesion and migration of oral epithelial cells: Implications for dentogingival regeneration. *Acta Biomater.* 2022; 147:209-220. doi: 10.1016/j.actbio.2022.05.035.
43. Abbarin N, San Miguel S, Holcroft J, Iwasaki K, Ganss B. The enamel protein amelotin is a promoter of hydroxyapatite mineralization. *J Bone Miner Res.* 2015;30(5):775-85.
44. Ikeda Y, Holcroft J, Ikeda E, Ganss B. Amelotin Promotes Mineralization and Adhesion in Collagen-Based Systems. *Cell Mol Bioeng.* 2022 Mar 27;15(3):245-254. doi: 10.1007/s12195-022-00722-2.
45. Neshatian M, Holcroft J, Kishen A, De Souza G, Ganss B. Promoting mineralization at biological interfaces *Ex vivo* with novel amelotin-based bio-nano complexes. *Mater Today Bio.* 2022 Apr 6; 14:100255.
46. Yamazaki-takai M, Takai H, Iwai Y, Noda K, Mezawa M, Tsuruya Y, Yamaguchi A, Nakayama Y, Ogata Y. MiR-200b suppresses TNF- α -induced AMTN production in human gingival epithelial cells. *Odontology.* 2021 Apr;109(2):403-410.
47. Detzen, L.; Chen, S.C.Y.; Cheng, B.; Papapanou, P.N.; Lalla, E. Increased Levels of Soluble CD163 in Periodontitis Patients. *J. Clin. Periodontol.* 2017;44; 585–5