



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- gua). 3: Apenas FDC-SP corada na região de ep t lio juncional (EJ) e ep t lio oral (EO). **Setas vermelhas** demonstram que nenhuma imunocolora o de FDC-SP foi observada no ep t lio juncional para o grupo Controle-Saúde. **Setas amarelas** demonstram um aumento de imunocolora o de FDC-SP para o grupo PE. **(1A, 1B)**. **Abreviaturas e símbolos:** Linha tracejada em amarelo delimita o da região do ep t lio juncional (EJ) Jun o-Cimento-Esmalte seta vermelha (1A). **Contracolora o:** Verde de Metila. **Barras de escala:** 100  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 localiza o e presença de inflama o 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.

1 INTRODUÇÃO*

De acordo com os critérios estabelecidos por Lang & Bartold, 2018¹ preservar a integridade da junção dentogengival é fundamental para manutenção de um periodonto sadio. Dentre suas estruturas que auxiliam na resolução da doença o epitélio oral (EO), epitélio sulcular (ES), epitélio juncional (EJ) e tecido conjuntivo merecem destaque. A preservação da inserção dentária é particularmente dependente da integridade do ES e do EJ, que ao contrário do EO não são queratinizados.² Estudos têm discutido que o “sistema de permeabilidade” do EJ possa estar associada às estruturas que o fixam a superfície dentária, tais como hemidesmossomos, lâmina basal interna e cemento.⁵ A permeabilidade tecidual do EJ permite que células residentes e substâncias migrem do tecido conjuntivo para o sulco gengival, limpando e neutralizando o desafio bacteriano contínuo, desempenhando um papel ativo no mecanismo de defesa inata.^{4,5} Em contraste, a destruição da integridade estrutural do EJ, que inclui a interrupção do contato célula a célula e o desprendimento da superfície ao dente é considerado o marco na conversão do EJ em epitélio de bolsa e, por sua vez no desenvolvimento da periodontite.

A imunocoloração com alvo aos marcadores de superfície CD80, CD163, CD66B, CD45, CD4 e CD8 têm sido utilizada para especificar tipos e subtipos de células em tecidos periodontais e peri-implantares.¹⁰⁻¹² Independentemente de seu papel como marcadores de superfície e fenótipos, essas proteínas contribuem para o início, progressão e resolução da inflamação com as seguintes funções distintas: CD80 (Th1) expresso por células apresentadoras de antígenos, sendo uma molécula de co-estimulação ativando as funções das células T, IL-12 e IL-2⁸; CD163 expresso por macrófagos/monócitos, apresenta efeitos anti-inflamatórios através da indução a liberação de citocinas IL-6, IL-4, IL-17, IL-10; CD66B e CD45 expressos constitutivamente de neutrófilos ou também conhecidos como leucócitos polimorfonucleares, independentemente da localização celular^{9,11,12}; CD8 (TH0) produz uma variedade de citocinas e quimiocinas através da diferenciação de células inflamatórias Th1 ou Th2¹⁰ e CD4 (Th1, Th2, Th17 e TREG) responsável pelo

* De acordo com as instruções do periódico Journal of Periodontal Research. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/16000765/homepage/forauthors.html>

reconhecimento de patógenos, eliminação e fagocitose de células estranhas e apresentação de antígenos.¹⁰

A junção-cimento-esmalte (JCE) é capaz de secretar uma série de moléculas biologicamente ativas, entre as quais encontram-se 17 proteínas conhecidas ou em fase de investigação derivadas da matriz do esmalte.^{13,14} As mais estudadas são a amelogenina e a ameloblastina e as recém-descobertas subunidades de Laminin-332 (LAM-332,) proteína secretada por células dendríticas foliculares (FDC-SP), proteína odontogênica associada ao ameloblasto (ODAM), fosfoproteína associada à odontogênese (ODAPH), fosfoproteína secretora de ligação ao cálcio prolina-glutamina rica 1 (SCPPPQ1) e amelotina (AMTN).^{13,15,16} Parece existir uma hierarquia entre as proteínas, no qual a expressão gênica do ameloblasto sinaliza a secreção e síntese das demais durante os estágios de formação e maturação do esmalte dentário.¹³ A AMTN, dada sua especificidade e localização foi originalmente localizada no EJ e EO de camundongos.^{13,14,17} Acredita-se que, devido a interface de sua localização da AMTN uma de suas funções seja a inserção e/ou reinserção do elemento dentário, no entanto este fato ainda não foi totalmente esclarecido.¹⁸ Diferentemente, evidências demonstram que a FDC-SP atua como um reservatório de linfócitos B ativos.¹⁹ Sendo assim, é plausível que com o aumento da expressão de FDC-SP ocorra um aumento da migração de linfócitos B e ativação de quimiocinas, logo, podem contribuir na regulação da resposta imune tecidual.²⁰ Por outro lado, altos níveis de LAM-332 relacionam-se na formação e integridade de hemidesmossomos, ou seja adesão do EJ ao dente.²¹

Uma vez que, a periodontite e a desintegração do EJ estão associadas é possível dizer que a expressão dessas proteínas esteja interligada por meio de uma via de etiopatogenia comum, e o aumento da expressão possa contribuir para a proteção do EJ em condições de doença periodontal. A associação entre gengivite e a expressão de AMTN, foi descrita por estudo experimental em humanos, no qual avaliou-se a expressão de citocinas pró-inflamatórias perante a transcrição de AMTN em fibroblastos gengivais.²² Neste trabalho, os autores destacam o aumento da transcrição de AMTN frente ao quadro de inflamação. Estes achados, descrevem a ocorrência da resposta imune no EJ, onde citocinas pró-inflamatórias são capazes de induzir a expressão do gene AMTN.²² Outro estudo, associou a expressão local de AMTN em tecidos gengivais inflamados de camundongos e de humanos com

periodontite crônica. Seus dados sugerem um padrão de expressão de AMTN perante a interface do EJ e sulco gengival e superfície dental, e papel fundamental na adesão celular e mineralização da superfície do esmalte, como também descontrolo de sua concentração frente à migração apical do epitélio em decorrência da periodontite.²³

Certamente, a recente descoberta das proteínas expressas no EJ abrem portas para novos desfechos sobre a saúde e a periodontite. A regulação de níveis da AMTN, LAM-332 e FDC-SP podem sugerir um envolvimento na aderência do epitélio com a superfície dentária e, portanto, a manutenção da integridade dos tecidos periodontais frente a agentes agressores. A hipótese do estudo é de que poderia haver um aumento da expressão de proteínas derivadas da matriz do esmalte na presença de inflamação induzida pela instalação de ligadura. Assim o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão da AMTN, LAM-332 e da proteína secretada por células dendríticas foliculares (FDC-SP) e sua correlação na regulação da resposta imuno-inflamatória no EJ de ratos submetidos a um modelo de indução de periodontite experimental.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em ambiente com temperatura controlada ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade 65-75%, ciclos de luz de 12/12, e receberam ração e água *ad libitum*. O protocolo experimental (#00608-2020) foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA; Anexo A) e sendo reportado de acordo as Diretrizes do ARRIVE.²⁴

Baseado no cálculo da amostra de trabalhos publicados na literatura²⁵⁻²⁹, e, considerando a diferença mínima entre as médias, desvio padrão do erro e poder de 80% para se determinar o número de animais necessários para cada grupo experimental, foi indicado pelo programa que o número mínimo de animais seria de 6 por grupo experimental considerando a perda óssea alveolar da área de furca como desfecho primário. Oito animais foram utilizados com base na análise histométrica da perda óssea interproximal.²⁹

Dezesseis ratos adultos (*Rattus norvegicus*, Wistar) com aproximadamente 3 meses de idade e peso variando entre 300 e 350 g foram aleatoriamente alocados em dois grupos experimentais (n=8/grupo): Controle-Saúde (S) - sem indução de periodontite experimental; periodontite experimental (PE) - Indução de periodontite experimental nos primeiros molares inferiores esquerdos por 15 dias.

2.2 Indução da Periodontite Experimental

Para a instalação da ligadura, os animais foram submetidos à injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina (80 mg/kg; Cetamim, Syntec, Santana do Parnaíba, São Paulo, Brazil) e cloridrato de xilazina (6 mg/kg; Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil). A PE foi induzida pela instalação de um fio de algodão (Corrente, algodão 24, Coats Corrente, São Paulo, Brasil) ao redor do primeiro molar inferior esquerdo e a ligadura foi mantida por 15 dias em posição sub-gengival.²⁵

2.3 Processamento Histológico

Todos os animais foram eutanasiados por injeção intramuscular de uma dose letal de tiopental (150 mg/kg; Cristália, Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil) e lidocaína 2% (10 mg/kg) aos 15 dias imediatamente após a remoção da ligadura no grupo PE. As hemi-mandíbulas esquerdas foram dissecadas e submetidas a solução fixadora, constituída de 4% de formaldeído (Sigma-Aldrich Co.) em tampão fosfato-salino (PBS, 0,1 M, 4°C, pH 7,4), por um período de 48 horas. Após a fixação, as hemi-mandíbulas esquerdas foram cuidadosamente manuseadas e submetidas à desmineralização em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10% por 2 meses.²⁶ Posteriormente, os espécimes foram desidratados por imersão em diluições seriadas de álcool. Após inclusão em parafina, as amostras foram seccionadas no plano sagital, sempre seguindo o longo eixo do dente em lâminas de 4 µm de espessura no sentido méso-distal.²⁶ Os cortes seriados da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo foram coletados, montados em lâminas de vidro e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) ou submetidos ao processamento imunohistoquímico.

2.4 Análise Histopatológica

Foi realizada uma análise histológica semi-quantitativa de acordo com Miessi et al.²⁷ utilizando escores, que variaram da menor para a maior alteração em % de espécimes e mediana, por um histologista certificado (EE) nas regiões de furca e interproximal para os seguintes parâmetros e características dos tecidos (Tabela 1):

- 1) *Intensidade da resposta inflamatória local*: escore 0 – ausência de inflamação; escore 1 – pequena quantidade de células inflamatórias; escore 2 – moderada quantidade de células inflamatórias; escore 3 – grande quantidade de células inflamatórias;
- 2) *Extensão do processo inflamatório*: escore 0 – ausência de inflamação; escore 1 – estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca; escore 2 – estendendo-se por todo o tecido conjuntivo da região de furca; escore 3 – estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e ósseo da região de furca;

- 3) *Padrão de estruturação do tecido conjuntivo*: escore 0 – moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas com tecido conjuntivo denso; escore 1 – moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas; escore 2 – pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas e edema intersticial; escore 3 – desestruturação tecidual severa com edema intersticial e áreas de necrose;
- 4) *Padrão de estruturação do tecido ósseo alveolar*: escore 0 – trabéculas ósseas de contorno regular e repletas de osteoblastos ativos, incluindo áreas de neoformação óssea; escore 1 – trabéculas ósseas de contorno irregular recobertas tanto por muitos osteoblastos quanto por osteoclastos ativos; escore 2 – trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos; escore 3 – áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos.

2.5 Análise Histométrica

Previamente à realização das análises histométricas, um examinador (NAG) foi treinado através da dupla mensuração de 24 espécimes, com o intervalo de 1 semana. O coeficiente de correlação de *Pearson* mostrou um alto grau de correlação (0,95) entre os dois momentos de mensuração para todas as análises. A área de perda óssea alveolar (POA) na região de furca de cada seção foi medida duas vezes pela mesma examinadora em dias diferentes para reduzir variações nos dados. Os valores médios foram calculados e comparados estatisticamente.

Depois de excluir a primeira e a última seções em que a região de furca era evidente, três seções equidistantes de cada bloco de amostra foram selecionadas e fotografadas usando uma câmera digital acoplada a um microscópio de luz (AxioStar Plus; Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 37030 Gottingen, Alemanha).²⁸ As fotomicrografias previamente adquiridas das lâminas histológicas submetidas à coloração pela HE foram analisadas através do software ImageJ® (versão 1.51i; National Institutes of Health, Bethesda/MD, EUA). A POA na região de furca (mm²), que compreende a área entre a crista óssea e a superfície do cimento, do primeiro molar inferior esquerdo, foi determinada histometricamente em mm² usando um

sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Alemanha). A POA na região de furca de cada secção foi medida duas vezes pelo mesmo examinador em dias diferentes para reduzir variações nos dados e os valores médios foram obtidos.

Para avaliar a perda óssea interproximal (POI) pela distância entre pico da crista óssea alveolar e da junção cimento esmalte da região interproximal, uma linha reta virtual da JCE entre 1º e 2º molares inferiores esquerdos foi delimitada, seguida de uma segunda linha de encontro ao ponto médio até o pico da crista óssea alveolar em mm, utilizando o *software ImagePro Plus 10* (Media Cybernetics; Rockville, USA).²⁹ A contagem em mm foi realizada com auxílio das ferramentas “*Line tool*” e “*Measurement Table*”.

2.6 Processamento para Imunohistoquímica

Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol e submetidos à técnica de imunoperoxidase indireta. A recuperação do antígeno foi realizada por imersão das lâminas histológicas em tampão citrato 0,1 M (pH 7,4; Diva decloaker®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) em uma câmara pressurizada (Decloaking Chamber®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) em 95°C por 20 minutos. As lâminas histológicas foram lavadas em PBS 0,1 M, pH 7,4 e posteriormente, imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e 1% de soro albumina bovino por 12 horas para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas contendo amostras de cada grupo experimental foram categorizadas em lote. O lote foi incubado com o anticorpo primário, anti-TRAP (Fosfatase Ácida Tartarato Resistente; Goat anti-trap – Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA; SC 30833). Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado por 2 horas e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte - HRP por 1 hora (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). A revelação foi realizada utilizando como cromógeno o 3,3'-tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). Foi realizada a contracoloração com Hematoxilina de Harris.

Para a técnica de imunofluorescência indireta, os cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol. A recuperação antigênica foi realizada por meio da imersão em tampão citrato (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, EUA), em câmara pressurizada (Decloaking chamber®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) a 95°C, por 20 minutos. No final de cada etapa da reação, as lâminas serão lavadas em TBS. Essas lâminas foram divididas em 9 lotes, os quais foram incubados por 12 horas com um dos seguintes anticorpos primários: Anti-CD4 do rato gerado em coelho (Ab237722), Anti-CD8 do rato gerado em coelho (Ab237709), anti-CD66b do rato gerado em coelho (Ab197678), anti-CD163 do rato gerado em coelho (Ab182422), anti-CD45 do rato gerado em camundongo (Ab33923), anti-CD80 do rato gerado em camundongo; anti-AMTN do rato gerado em camundongo (cedido pelo Dr. B. Ganss); anti-FDC-SP do rato gerado em camundongo (cedido pelo Dr. T. Shinomura); anti-laminin γ 2 do rato gerado em camundongo (cedido pelo Dr. B. Ganss). Os cortes foram incubados com anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa-Fluor®555 gerado em burro (ab150110, Abcam, EUA) ou anti-IgG de coelho conjugado com Alexa-Fluor®488 gerado em burro (ab150073, Abcam, EUA). Na sequência os núcleos foram corados por 30 minutos com dicloridrato de 4', 6- diamidino-2-fenilindol (DAPI, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Ao final, as lâminas foram montadas com auxílio do ProLong Diamond Antifade Mountind (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA). A análise por imunofluorescência foi realizada no Cancer Invasion and Metastasis Laboratory, chefiado pelo Prof. Marco Magalhães, na University of Toronto. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização do anticorpo primário. As etapas da técnica de imunoperoxidase foram baseadas em protocolos já descritos.²³

2.7 Análise imunohistoquímica para células TRAP-positivas

Um examinador calibrado (EE) selecionou uma secção histológica de (TRAP) para cada espécime. As células imunorreativas para TRAP chamadas TRAP-positivas, foram consideradas como aquelas que se apresentavam multinucleadas e com uma coloração marrom-escura confinada ao seu citoplasma. A imunomarcagem foi definida como aquela de coloração acastanhada presente no compartimento

citossólico das células positivas. A análise quantitativa da imunomarcacão foi realizada por um examinador calibrado (EE) por meio da contagem de células TRAP positivas localizadas no centro do septo interradicular e interproximal do primeiro molar inferior de uma área de 1000µm x 1000µm, com um aumento de 200x em três cortes histológicos equidistantes.²⁸ O limite coronário desta área foi a crista óssea alveolar, a partir da qual se estendia apicalmente por uma distância de 1000µm.²⁸ Os resultados foram expressos em células por mm² (cél/mm²), sob a forma de média e desvio padrão em cada grupo experimental.

2.8 Análise Imunohistoquímica Fluorescente

Após 1 hora de incubacão com anticorpos secundários em temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas e coradas com DAPI (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) por 30 minutos. As amostras foram montadas usando o *ProLong Diamond Antifade Mounting media* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e capturadas no mesmo dia usando um microscópio *Quorum Spinning Disk Confocal* (Quorum Technologies Inc., Puslinch, Canadá). Dez imagens de cada lâmina foram tiradas usando objetivas de 10x e lentes de ampliacão de 1,6x. Os campos da imagem foram selecionados aleatoriamente e as coordenadas X, Y foram usadas para evitar sobreposições. A análise das imagens foi realizada com o *software Volocity 3D Image Analysis* (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA). Foram avaliadas a intensidade de AMTN, LAM-332 e FDC-SP, e as populações de CD45+ CD66b+, CD8, CD4, CD163 e CD80.

A correlacão da intensidade da coloracão do canal foi realizada usando limiares gerados automaticamente com base no estudo de Costes et al.³⁰. O limiar para colocacão foi determinado pelo ajuste linear de mínimos quadrados das intensidades LAM-332/FDC-SP sobre todos os pixels da imagem ($IG = \alpha \times IR + b$) e um canal mostrando o produto da diferença das médias foi gerado e fixado para todas as amostras (Lam=4000/FDCSP=8000).³¹ Definiu-se como área de intensidade em µm² as regiões: epitélio juncional e no epitélio oral (região equidistante). A colocacão foi avaliada em ambas as regiões. Foram excluídas amostras com corte dobrado ou anormal. Diferentes leituras de cada área foram realizadas para se atingir um valor mediano.³¹

2.9 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com o software *Bioestat* (Versão 5.3, Bioestat, Instituto Mamirauá, Manaus, Brasil), com 5% de nível de significância. A análise dos dados histométricos e imunohistoquímicos dos grupos Controle-Saúde e PE foi realizada por meio do teste de *Shapiro-Wilk* e teste *t Student* e histopatológica por *Kruskal-Wallis*. As análises de correlações entre a expressão dos marcadores inflamatórios, por meio de intensidade de fluorescência em pixel, com a expressão de proteínas AMTN, FDC-SP e LAM-332, foram realizadas pelo coeficiente de correlação de *Pearson*.

3 RESULTADOS

3.1 Análise Histopatológica

O grupo PE apresentou maior intensidade e extensão da resposta inflamatória local, padrão de estruturação do tecido conjuntivo e de osso alveolar em comparação ao grupo Controle-Saúde para o período de 15 dias ($p < 0,05$; Tabela 1; Figura 1).

3.2 Análise Histométrica

Os dados demonstraram maior POA, com diferença estatisticamente significativa no grupo PE ($111,85 \pm 51,56 \text{ mm}^2$) quando comparado ao grupo Controle-Saúde ($51,56 \pm 10,31 \text{ mm}^2$) na região de furca ($p < 0,001$; Figura 2A).

Na região interproximal houve maior POI, com diferença estatisticamente significativa no grupo PE ($173,42 \pm 45,34 \text{ mm}$) quando comparado ao grupo Controle-Saúde ($53,19 \pm 34,83 \text{ mm}$; $p < 0.0001$; Figura 2B).

$$173,42 \pm 45,34$$

3.3 Análise Imunohistoquímica – células TRAP-positivas

A PE induziu um aumento significativo na quantidade de células TRAP-positivas aos 15 dias em comparação ao grupo Controle-Saudável ($p < 0,01$; Figura 3A).

No grupo Controle-Saúde, os osteoclastos TRAP-positivos apresentavam-se hipernucleados, arredondados e relativamente distantes da matriz óssea, isto é, desacoplados. Estas condições são, de modo geral, características da inatividade destas células. Já para o grupo PE os osteoclastos “TRAP-positivas” apresentavam-se, em sua maioria, acoplados ou próximos à matriz óssea, polarizados, com quantidade de núcleos e morfologia normais, ou seja, condizentes com um aspecto de atividade celular (Figura 3B).

3.4 Análise da Intensidade Imunofluorescente em Pixel das proteínas e dos Marcadores de Superfície Inflamatória

Houve um aumento significativo na intensidade de imunomarcação dos níveis de AMTN no grupo PE, quando comparado ao grupo Controle-Saúde ($p < 0,05$; Figuras 4 e 6A). Nenhuma diferença estatística foi observada para os níveis de LAM-332 e FDC-SP ($p = 0,57$; Figuras 5, 7B e 7C) entre os grupos.

Houve um aumento significativo na expressão de macrófagos CD163 ($p < 0,04$; Figura 7a), neutrófilos CD66B ($p < 0,003$; Figura 7), macrófagos CD80 ($p < 0,006$; Figura 7c), linfócitos CD8 ($p < 0,01$; Figura 7d) e linfócitos CD45 ($p < 0,04$; Figura 7e), no grupo PE, quando comparado ao grupo Controle-Saúde para o período de 15 dias.

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

Nenhuma diferença estatística foi observada, na análise de correlação de AMTN, LAM-332 e FDC-SP com a intensidade de expressões dos marcadores de superfície inflamatória para o grupo PE aos 15 dias ($p > 0,05$).

4 DISCUSSÃO

Com a finalidade de fornecer novas evidências na suscetibilidade da periodontite, especialmente a nível da patogênese periodontal, descrevemos um protocolo experimental que avaliou a expressão de AMTN, LAM-332 e FDC-SP e marcadores de superfície inflamatória, por meio de análises histopatológicas, histométricas, imunohistoquímica e imunofluorescência em tecidos periodontais de ratos com PE induzida e em controles saudáveis. Nosso estudo identificou um aumento significativo na expressão de AMTN associada à presença de PE ($p < 0,05$), deslocamento progressivo e apical do EJ, aumento do infiltrado inflamatório e estímulo do processo de reabsorção óssea interproximal para o período de 15 dias.

Nos últimos anos, o modelo de eleição para indução da PE em ratos utilizado pelo nosso grupo de pesquisa²⁵⁻²⁸ baseia-se no clássico modelo de ligadura.^{35,36} Esse modelo têm sido muito utilizado em estudos por promover um aparecimento rápido de uma microbiota oral disbiótica, simulando o modelo de placa sub-gengival em humanos, que abriga mais de 700 espécies microbianas reconhecidas.^{37,38} Dentre elas, apenas uma minoria tem poder de virulência que leva à periodontite quando seu equilíbrio é comprometido.³⁷ Diferentemente dos modelos que realizam inoculação oral de cepas (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Treponema denticola*) diretamente ao sulco gengival em roedores,^{23, 34, 39, 40} Uma vez que a inflamação ocorre, é impossível dissociar os efeitos destrutivos dos tecidos das bactérias, daquelas causadas pelas células imuno-inflamatórias.

Recentemente, evidências demonstraram que a AMTN juntamente com LAM-332, são moléculas biologicamente ativas constituintes da lâmina basal interna.^{16, 21, 40} Estrutura da qual, ao sofrer o rompimento de sua interface adesiva, favorece o “sistema de permeabilidade” do EJ e a formação da bolsa periodontal.^{1,5} O estudo *in vitro* de Fouillen et al.⁴⁰, é consistente em destacar que AMTN e ODAM tem sua matriz extracelular adesiva rapidamente degradada por *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Treponema denticola*, sugerindo que a degradação contribua para a progressão da doença periodontal.⁴⁰ Como descrito anteriormente, a variabilidade dos níveis de AMTN pode ser um dos fatores associados a desintegração do EJ,

promovendo alterações no metabolismo tecidual e celular, aumentando potencialmente a suscetibilidade à doença periodontal.⁴¹

No presente estudo observou-se, um aumento significativo na expressão de AMTN associado a presença de PE no período de 15 dias de indução da doença ($p < 0,05$). Nakayama et al.²³ relataram que a expressão de FDC-SP e AMTN foram aumentadas no EJ de camundongos infectados por *P. gingivalis* em estágios agudos (8 dias) e diminuída em estágios de inflamação crônica (30 dias), enquanto a expressão de ODAM foi aumentada para todos os períodos.²³

Apesar da maioria dos estudos observarem uma associação entre a LAM-332 e as proteínas (AMTN, ODAM, ODAPH e SCPPPQ1), as mesmas não podem ser utilizadas para descrever uma relação de causa e efeito perante os tecidos periodontais.^{4,21,16,40,42} Em camundongos, a falta de expressão da LAM-332 culminou na perda de aderência tecidual a pele e/ou mucosas.⁴ Nos achados do presente estudo, apesar de ter sido observado menor expressão associada à presença de PE para LAM-332, não houve uma redução estatisticamente significativa ($p = 0,57$). No entanto, dados recentes indicam que SCPPPQ1 e LAM-332 podem acelerar e fortalecer a adesão de células epiteliais juncionais.⁴²

No presente estudo à análise histométrica da perda óssea alveolar da região interproximal revelou um aumento significativo na distância entre o pico da crista óssea alveolar e a JCE ($p < 0.0001$) para o grupo PE, como consequência da resposta inflamatória e aumento da reabsorção óssea. Estudos iniciais *in vitro* e em camundongos apontam para um real benefício da AMTN na mineralização do tecido ósseo.^{43,44,45} Tal achado pode vir à corroborar a recente hipótese de que devido a interface da localização da AMTN uma de suas funções seja a inserção e/ou reinserção do aparato dentário.⁴³ De maneira semelhante, a reabsorção óssea alveolar foi avaliada por meio de microtomografia computadorizada associada a expressão dos níveis de FDC-SP (mRNA) na presença ou ausência de PE induzida por ligadura em ratos.²⁰ Os resultados descrevem reação inflamatória associada a reabsorção óssea alveolar elevada por 7 dias (estágios iniciais), mas não houve diferenças significativas para os períodos de 14 e 28 dias.²⁰

De acordo com os resultados da análise de quantificação de células TRAP-positivas observou-se aumento significativo de osteoclastos para a região interproximal aos 15 dias ($p < 0,01$). Oshiro et al.³⁴ corroboram com tal achado, uma vez que, células TRAP-positivas também foram detectadas na crista óssea alveolar após a quinta aplicação de *E.coli* (LPS). Takahashi et al.²⁰ avaliaram a expressão gênica de RANKL/OPG, moléculas importantes durante o processo de degradação da matriz óssea mediada pelos osteoclastos. Os resultados demonstram que a razão RANKL/OPG e os níveis de IL-17 aumentaram significativamente os níveis de reabsorção óssea alveolar após a indução de PE e os níveis de FDC-SP reduziram aos 7 dias.²⁰ Em nosso estudo, acreditamos estar em concordância com tal achado, uma vez que observamos uma similaridade dos níveis de expressão de FDC-SP para o grupo PE com o grupo Controle-Saúde, aos 15 dias.

Embora a literatura publicada até o momento descreva os mecanismos das proteínas derivadas da matriz do esmalte, associada principalmente a terapias regenerativas periodontais, seu papel perante a resposta imuno-inflamatória dos tecidos periodontais ainda não estão totalmente esclarecidos. Estudos têm demonstrado repercussões de que a expressão de AMTN pode ser regulada pelo fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6) frente à resposta inflamatória.^{22,48} Curiosamente no estudo de Oshiro et al.³⁴ em ratos experimentais infectados por LPS, descreveram um envolvimento da FDC-SP na resposta imune adquirida frente à periodontite instalada, através do aumento de IL-17 e de células T CD4+. Apesar dos marcadores de superfície inflamatória desempenharem um papel importante durante a inflamação, fato corroborado no presente estudo, nossos resultados não encontraram associação entre os marcadores de inflamação e os níveis de expressão de AMTN, LAM-332 e FDC-SP aos 15 dias ($p > 0,05$). Tais achados, podem estar associados a variação da expressão e os diferentes tipos celulares de CD163, CD80, CD4 e CD8 possivelmente respondam a diferentes estímulos, bem como na polarização de macrófagos.⁴⁶

Levando-se em consideração as limitações deste estudo, destacamos a heterogeneidade entre os modelos e divergência referente ao modelo de indução de periodontite experimental associado à expressão das proteínas derivadas da matriz do esmalte. Sugerimos que mais estudos envolvendo estágios iniciais (7 dias) de

periodontite experimental sejam realizados para a descrição e rastreamento do perfil imuno-inflamatório associado aos marcadores de superfície inflamatória. Os resultados do presente estudo abrem caminhos para uma série de novos questionamentos, sobre o papel da AMTN, LAM-332 e FDC-SP na patogênese da doença periodontal. Estudos avaliando a interação de AMTN e FDC-SP no EJ por exemplo, podem sugerir um envolvimento na aderência e resistência do epitélio com a superfície dentária e o aumento da expressão contribuindo para a proteção do epitélio juncional longo na periodontite.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que a expressão da amelotina pode estar associada a presença da periodontite em ratos com periodontite experimental.

Agradecimentos

Este estudo obteve apoio financeiro proveniente da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES; código 001) e do Projeto CAPES *Print* (Processo nº. 88887.571136/2020-00).

Conflito de Interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse relacionados ao estudo.

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

TABELAS

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

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA				
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES			
	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	GRUPO CONTROLE		GRUPO PE	
	REGIÃO DE FURCA	REGIÃO INTER-PROXIMAL	REGIÃO DE FURCA	REGIÃO INTER-PROXIMAL
INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL				
1) ausência de inflamação	100%	100%	-	-
2) inflamação discreta (até 1/3 das células são inflamatórias)	-	-	37,5%	62,5%
3) inflamação moderada (de 1/3 até 2/3 das células são inflamatórias)	-	-	62,5%	37,5%
4) inflamação intensa (mais de 2/3 das células são inflamatórias)	-	-	-	-
MEDIANA E DESVIO INTERQUATIS	1 (1 – 1)	1 (1 – 1)	3 (2 – 3)^{†‡}	3 (2 – 3)^{†‡}
EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO				
1) ausência de inflamação	100%	100%	-	-
2) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo supra-alveolar	-	-	75,0%	75,0%
3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo supra-alveolar	-	-	25,0%	25,0%
4) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo supra-alveolar e atingindo o tecido ósseo alveolar	-	-	-	-
MEDIANA E DESVIO INTERQUATIS	1 (1 – 1)	1 (1 – 1)	2 (2 – 3)^{†‡}	2 (2 – 3)^{†‡}
PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO				
1) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas (tecido conjuntivo denso)	100%	100%	-	-
2) moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	-	-	12,5	12,5
3) pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	-	-	87,5	87,5
4) desestruturação tecidual severa com áreas de necrose	-	-	-	-
MEDIANA E DESVIO INTERQUATIS	1 (1 – 1)	1 (1 – 1)	3 (2 – 3)^{†‡}	3 (2 – 3)^{†‡}

PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO ALVEOLAR				
1) trabéculas ósseas de contorno regular com áreas de remodelação óssea	100%	100%	-	-
2) trabéculas ósseas de contorno irregular recobertas por pequena quantidade de osteoclastos ativos	-	-	25,0%	37,5%
3) trabéculas ósseas de contorno irregular recobertas por grande quantidade de osteoclastos ativos	-	-	62,5%	62,5%
4) áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos	-	-	12,5%	-
MEDIANA E DESVIO INTERQUATIS	1 (1 – 1)	1 (1 – 1)	3 (2 – 4)^{†‡}	3 (2 – 3) ^{†‡}

Símbolos: †, Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle-Saúde – Região de FURCA; ‡, Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle-Saúde – Região INTERPROXIMAL.

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; **ab**, 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).

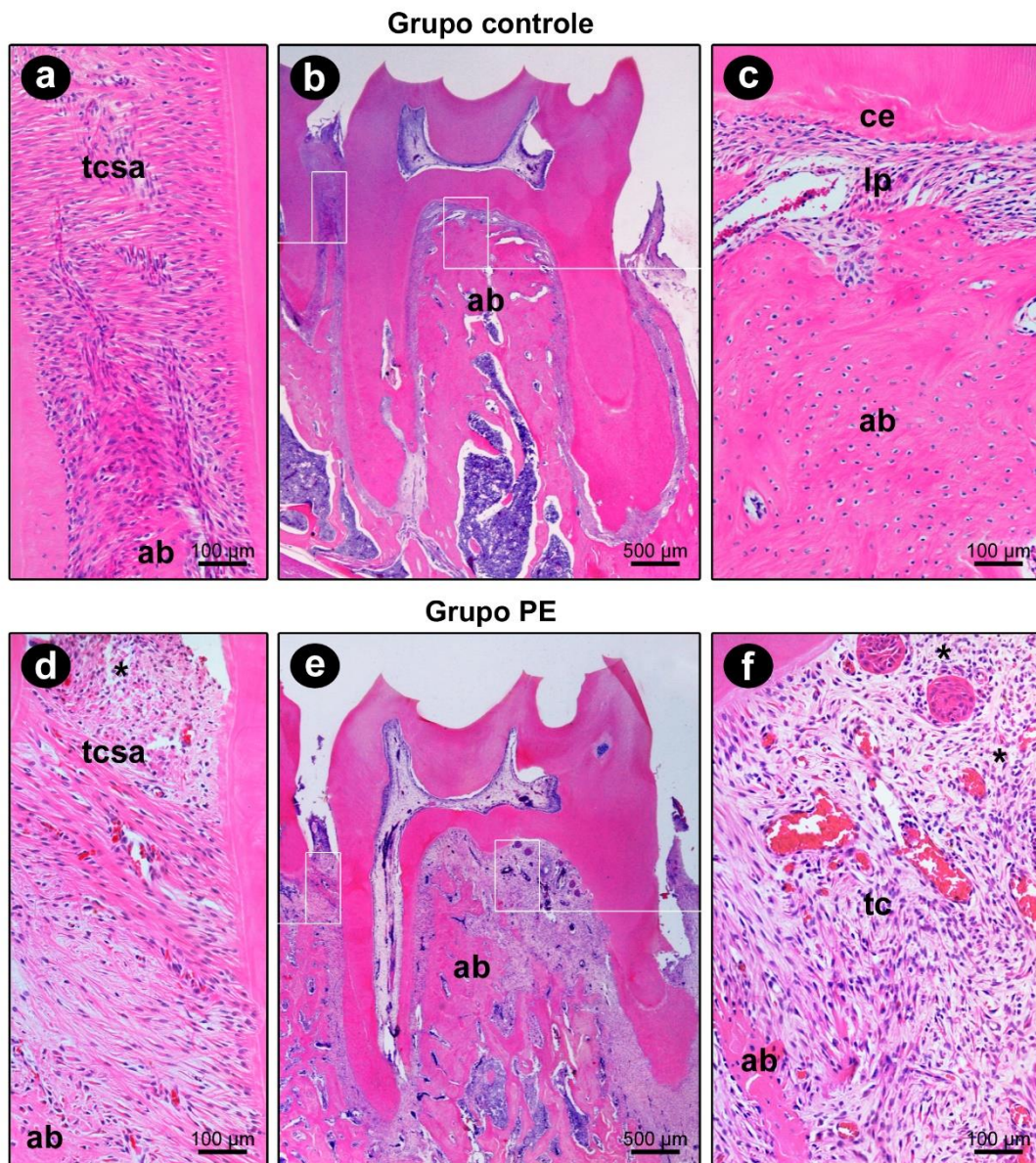


FIGURA 2 a) Gráfico indicando média e desvio padrão da perda óssea alveolar POA (mm^2), na região de furca nos diferentes grupos experimentais para o período de 15 dias. **b)** Gráfico indicando média e desvio padrão da medida linear expressa em mm, na região interproximal **Abreviaturas e símbolos:**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

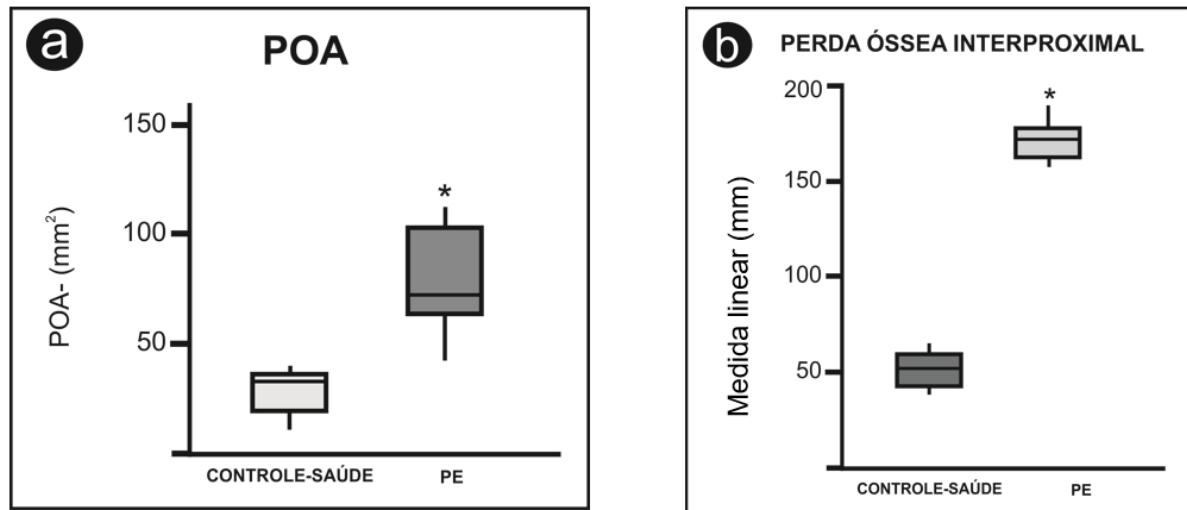


FIGURA 3 a) Gráfico indicando média e desvio padrão da imunomarcção de células TRAP-positivas da área de furca e interproximal nos grupos Controle-Saúde e PE aos 15 dias. **b-e)** Fotomicrografias evidenciando padrão de imunomarcção de células TRAP-positivas na região de furca (**b, c**) e interproximal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

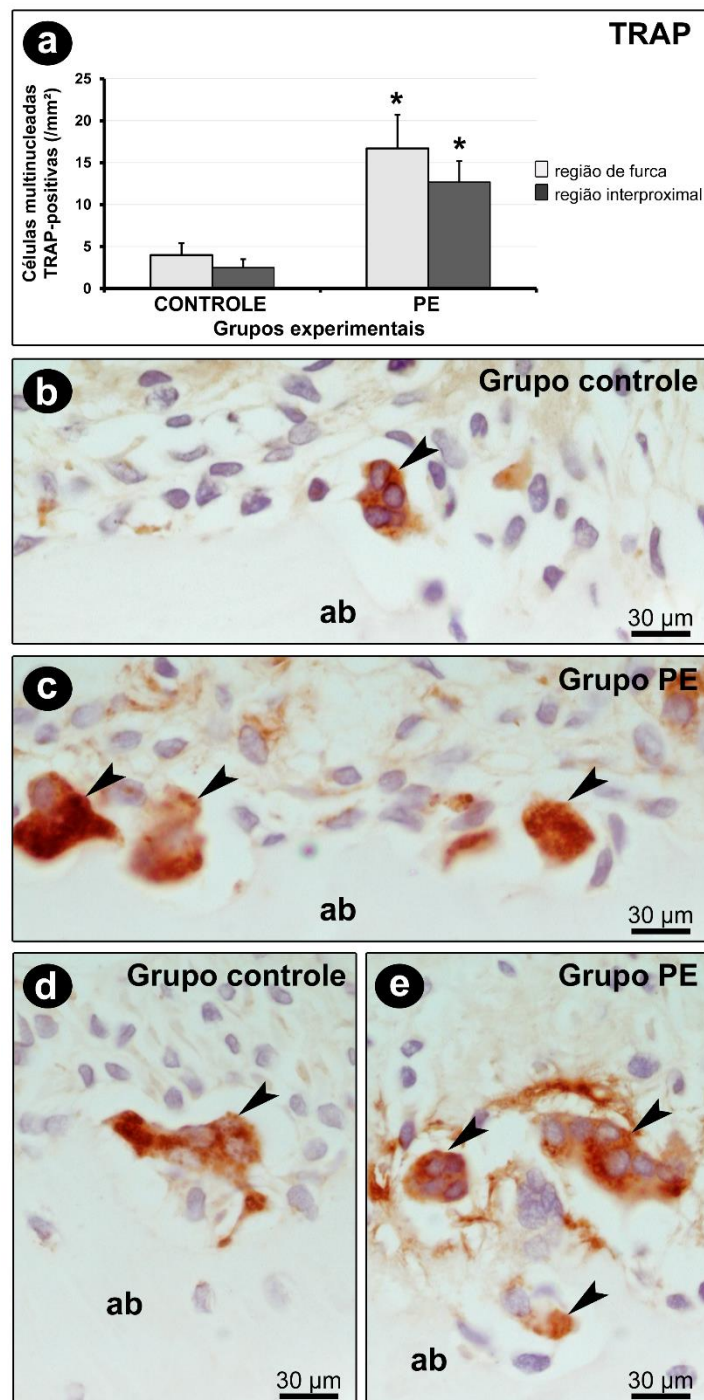


FIGURA 4 Fotomicrografias evidenciando a intensidade de imunomarcacão fluorescente de Amelotina (AMTN) no grupo Controle-Saúde **(A)** e PE **(B)**. 1-2: Núcleos de AMTN contrastados por DAPI (contraste - verde-água). 3: Apenas AMTN corada na região de epitélio juncional (EJ) e epitélio oral (EO). **Setas 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.

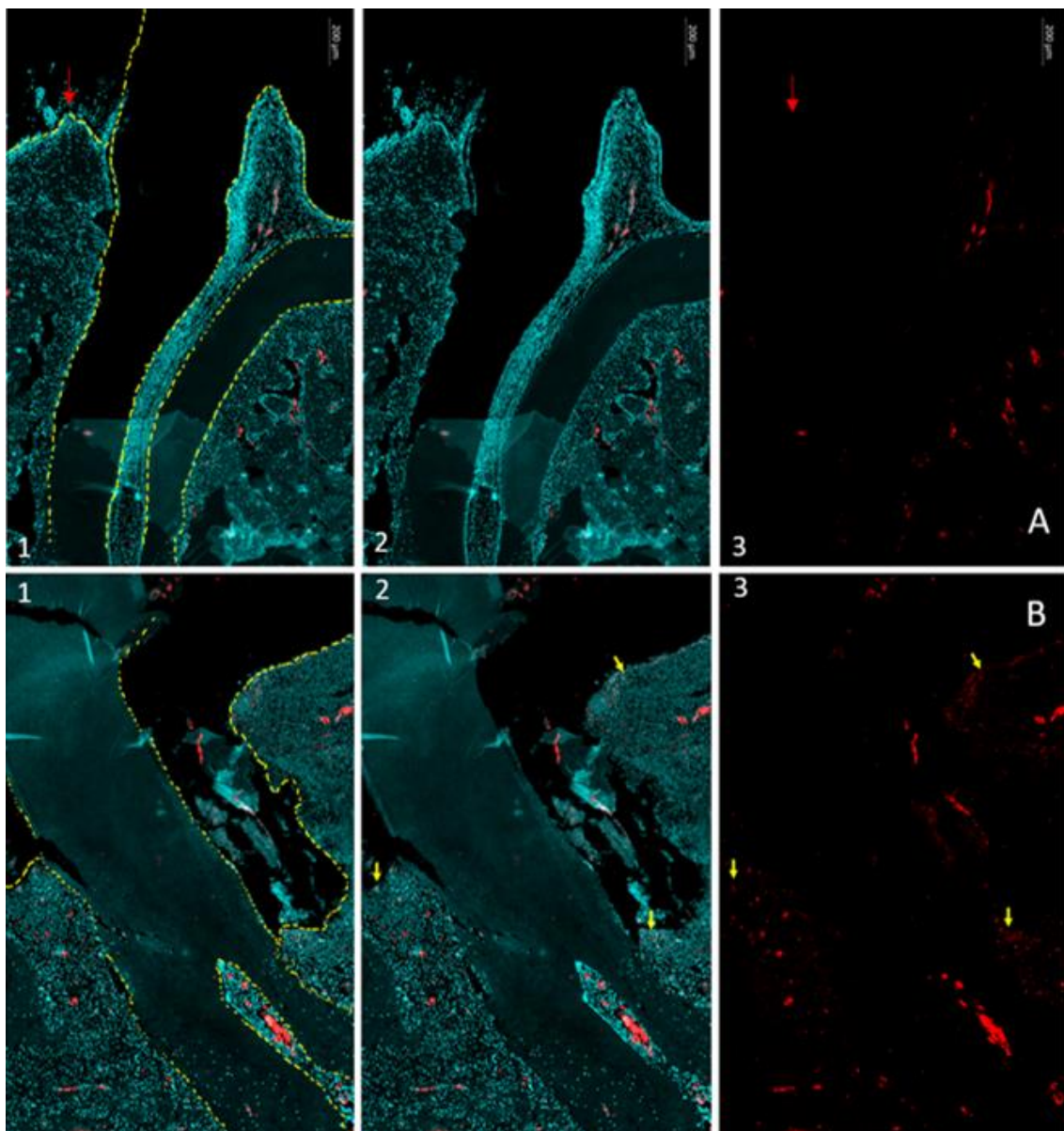


FIGURA 5 Fotomicrografias evidenciando a intensidade de imunomarcção fluorescente da proteína secretada por células dendríticas foliculares (FDC-SP) no grupo Controle-Saúde **(A)** e PE **(B)**. 1-2: Núcleos de FDC-SP contrastado por DAPI (contraste - verde-água). 3: Apenas FDC-SP corada na região de 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). **Seta vermelha** - Junção-Cimento-Esmalte - seta vermelha (1A). **Contracoloração:** Verde de Metila. **Barras de escala:** 100 μ m

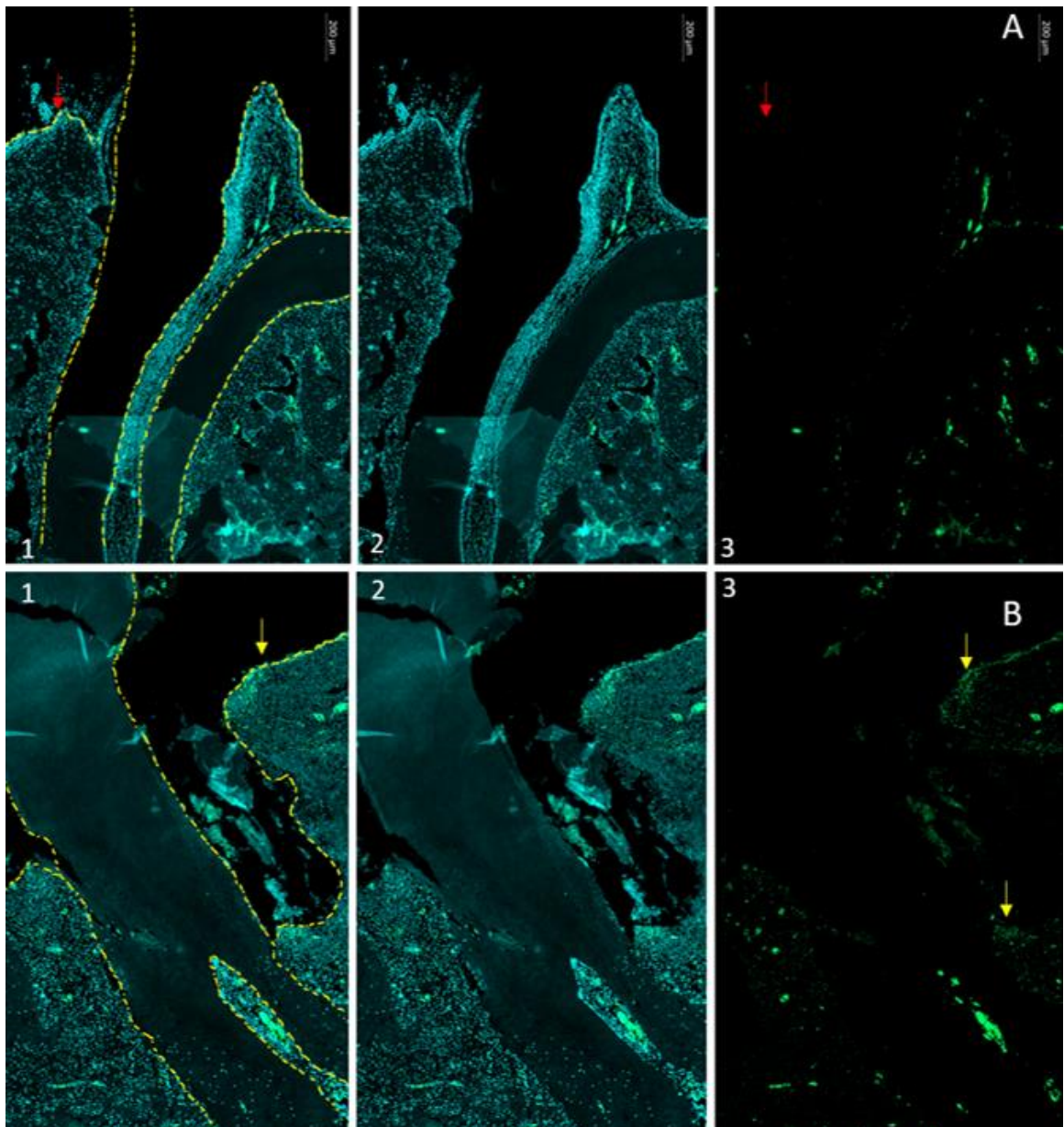


FIGURA 6 a) Gráfico do nível de expressão de AMTN nos grupos Controle-Saúde (a) e PE (b) aos 15 dias em intensidade de pixel. **b)** Gráfico do nível de expressão de FDC-SP nos grupos Controle-Saúde (a) e PE (b) aos 15 dias em intensidade de pixel. **c)** Gráfico do nível de expressão de LAM-332 nos 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)

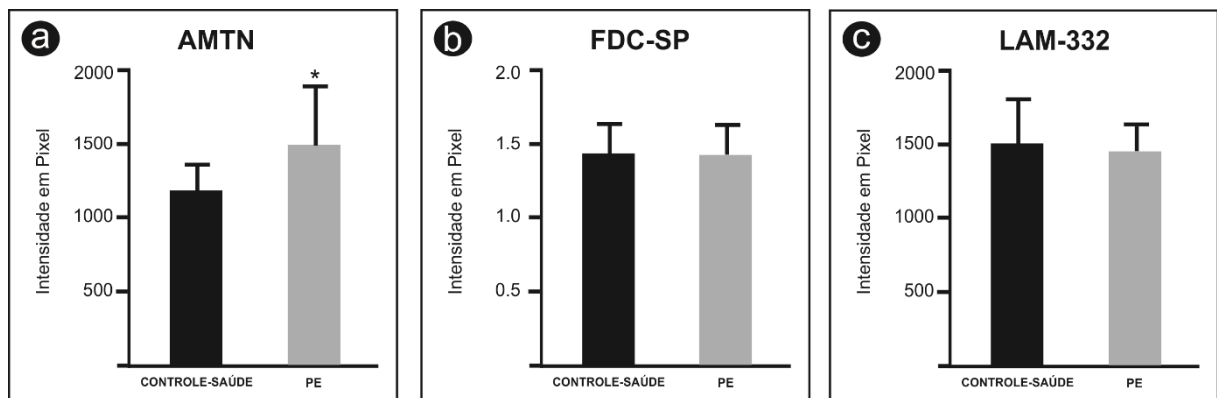
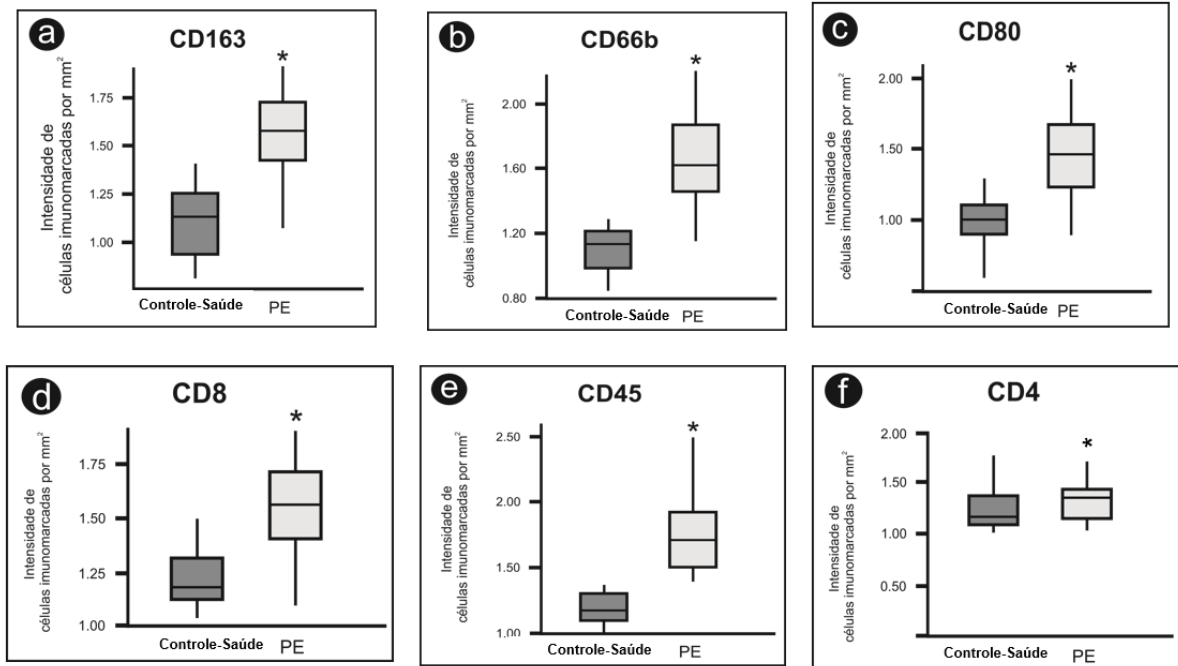


FIGURA 7 Gráficos dos marcadores de superfície inflamatória **a)** CD163; **b)** CD66B; **c)** CD80; **d)** CD8; **e)** CD45; **f)** CD4, de acordo com a localização e presença de inflamação no grupos Controle-Saúde e PE. **Abreviaturas e símbolos:** *, diferença estatisticamente significativa com o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



ANEXOS

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Expressão de proteínas derivadas da matriz do esmalte em ratos com periodontite experimentalmente induzida"**, Processo FOA nº 00608-2020, sob responsabilidade de Letícia Helena Theodoro apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 27 de Outubro de 2020.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 09 de Dezembro de 2022.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 09 de Janeiro de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Expression of enamel matrix-derived proteins in rats with experimentally induced periodontitis"**, Protocol FOA nº 00608-2020, under the supervision of Letícia Helena Theodoro presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 01, 2020.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 09, 2022.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 09, 2023.

Prof. Associado Guilherme de Paula Nogueira
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator