



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Programa de Pós-Graduação em Odontológicas  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000 Telefax: (35) 3299-1067



**MAGALI DE FÁTIMA PEREIRA MADUREIRA**

**INFLUÊNCIA DA TESTOSTERONA NO DESENVOLVIMENTO DAS  
ESTRUTURAS DENTOALVEOLARES: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Alfenas/MG

2022

**MAGALI DE FÁTIMA PEREIRA MADUREIRA**

**INFLUÊNCIA DA TESTOSTERONA NO DESENVOLVIMENTO DAS  
ESTRUTURAS DENTOALVEOLARES: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas-MG.

Orientador: Prof. Dr. Tomaz Henrique Araújo  
Coorientadora: Profa. Dra. Daniela Silva Barroso de Oliveira

Alfenas/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Madureira, Magalli de Fátima Pereira.

Influência da testosterona no desenvolvimento das estruturas dentoalveolares: estudo experimental em ratos / Magalli de Fátima Pereira Madureira. - Alfenas, MG, 2022.

56 f. : il. -

Orientador(a): Tomaz Henrique Araújo.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Periodonto. 2. Testosterona. 3. Dente. 4. polpa. I. Araújo, Tomaz Henrique, orient. II. Título.

MAGALI DE FÁTIMA PEREIRA MADUREIRA

INFLUÊNCIA DA TESTOSTERONA NO DESENVOLVIMENTO DAS ESTRUTURAS  
DENTOALVEOLARES: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Odontologia.

Aprovada em: 15 de março de 2022

Prof. Dr. Tomaz Henrique Araújo  
Instituição: Universidade Federal Alfenas - MG

Profa. Dra. Deila Rosely Carneiro  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - MG

Profa. Dra. Juliana Santos Neves  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - MG



Documento assinado eletronicamente por **Tomaz Henrique Araújo, Professor do Magistério Superior**, em 16/03/2022, às 11:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana dos Santos Neves, Professor do Magistério Superior**, em 17/03/2022, às 19:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Deila Rosely Carneiro, Professor do Magistério Superior**, em 18/03/2022, às 16:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0688277** e o código CRC **945C9A95**.

Dedico este trabalho à minha família, em especial, ao meu marido, Maurilio, e meus filhos, Lucas e André, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e colaborando para realização deste desafio.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus, por ter concedido vida e saúde para realização desse sonho.

A minha querida família, que torna meus dias mais felizes, motivo para que eu me desperte todos os dias e saiba que tenho motivos para continuar. Em especial, minhas irmãs que sempre me apoiaram, meu marido que dedicou grande parte de seu tempo cobrindo, minhas ausências em casa para que esse projeto fosse executado. Com ele dividi minhas aflições, inseguranças e percalços durante esse período.

Aos meus saudosos pais, com os quais queria muito estar compartilhando esse momento se estivessem presencialmente aqui. Eles foram minha base, minha fortaleza e meu melhor exemplo. Em suas memórias deixo aqui minha eterna gratidão por tudo que fizeram durante sua vida terrena por nossa família.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Tomaz Henrique Araújo, que foi sempre prestativo, pacificador, humano e experiente. Levarei comigo gravado em minha mente uma frase sempre dizia em meus momentos de contratempos durante a execução do projeto:

“Magali, você não é primeira e nem a última pessoa que está passando por isso! Vamos resolver!”. Palavras simples, mas com grande significado. Durante esses períodos de pandemia, me recebeu fora do seu expediente, sempre que precisei, até mesmo no seu lar, junto de sua família. Obrigada pela orientação experiente, que me passou sempre muita tranquilidade para resolver cada empecilho que surgiu nessa caminhada. Minha eterna gratidão.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Daniela Silva Barroso de Oliveira, minha gratidão além academia. Mais que coorientadora, foi amiga, confidente, uma completa mestra. Sempre com meiguice, sem perder autoridade, tornava tudo mais leve e com soluções possíveis. Agradeço todo ensinamento e carinho.

Ao meu amigo e parceiro de pesquisa Caio Luiz Bitencourt Reis, pessoa de grande coração, responsabilidade e inteligência. Aprendi muito com ele e espero que ele tenha muito sucesso em sua jornada.

Aos funcionários do laboratório de histologia da Unifal, onde fiz amigos e adquiri muitos conhecimentos. Fernando, Andréia e Luiz, meus agradecimentos.

Aos professores do Mestrado em Ciências Odontológicas da Unifal e aos discentes e colaboradores desta pesquisa, que possibilitaram minha formação e desenvolvimento como mestre.

Agradeço ao PIB-PÓS da UNIFAL/MG pelo fomento pessoal.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

A testosterona é o principal hormônio sexual esteroide masculino envolvido na diferenciação, desenvolvimento sexual e controle das funções reprodutivas masculina. A diminuição das concentrações de testosterona no indivíduo está associada a uma queda na densidade óssea mineral alveolar, entretanto, pouquíssimos estudos exploraram o impacto sobre o periodonto e sobre as estruturas dentárias. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da supressão de testosterona sobre o crescimento e desenvolvimento das estruturas dentárias, periodontais e alveolares em ratos durante a puberdade. Trinta e seis ratos da linhagem *Wistar* foram selecionados para este estudo. Orquiectomia (ORX) foi realizada nos animais do grupo experimental (n=18) e cirurgia *sham* nos animais do grupo controle (n=18) no 23º dia de vida. Os animais foram alocados em 4 grupos: um grupo ORX (n=9) e um grupo *sham* (n=9) eutanasiados aos 45 dias de vida, e o outro grupo ORX (n=9) e o outro *sham* (n=9) eutanasiados aos 73 dias de vida. Após o período experimental, os animais foram eutanasiados e as mandíbulas e maxilas foram retiradas, dissecadas e fixadas em formol a 10%, descalcificadas, cortadas a 7 µm e coradas com hematoxilina e eosina e picrosirius red. Análise qualitativa das lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina foram realizadas, enquanto que a síntese de colágeno obtida das lâminas coradas com picrosirius foi avaliada quantitativamente através do software ImageJ. A síntese de colágeno foi comparada entre os grupos pelo teste t de student através do software IBM SPSS. Histologicamente, os animais submetidos orquiectomia apresentaram variações na região periodontal, osso alveolar imaturo e ligamento periodontal com presença de células adiposas atípicas, nas estruturas dentárias, polpa hiperêmica com pontos de calcificação (nódulos) e variação no arranjo e forma dos odontoblastos, com considerável significância quando comparados com os animais do grupo Sham. Não houve diferença estatisticamente significativa para a síntese de colágeno entre os grupos. Conclui-se que a o déficit androgênico T induz a alterações na diferenciação das células que formam os tecidos das estruturas dentárias e alveolares, através da incidência de alterações pulpares, presença de células atípicas no ligamento periodontal e atraso na neoformação do osso alveolar de ratos durante a puberdade.

Palavras-chave: Periodonto. Testosterona. Dente. Polpa.

## ABSTRACT

Testosterone is the main male steroid sex hormone involved in differentiation, sexual development and control of male reproductive functions. Decreased testosterone concentrations in the individual are associated with a decrease in alveolar bone mineral density, however, very few studies have explored the impact on the periodontium and dental structures. The aim of this study was to evaluate the impact of testosterone suppression on the growth and development of dental, periodontal and alveolar structures in rats during puberty. Thirty-six Wistar rats were selected for this study. Orchiectomy (ORX) was performed on the animals of the experimental group (n=18) and sham surgery on the animals of the control group (n=18) on the 23rd day of life. The animals were allocated into 4 groups: an ORX group (n=9) and a sham group (n=9) euthanized at 45 days of age, and the other ORX group (n=9) and the other sham (n=9) ) euthanized at 73 days of age. After the experimental period, the animals were euthanized and the mandibles and maxillas were removed, dissected and fixed in 10% formalin, decalcified, cut at 7  $\mu$ m and stained with hematoxylin and eosin and picosirius red. Qualitative analysis of slides stained with Hematoxylin and Eosin were performed, while collagen synthesis obtained from slides stained with picosirius was quantitatively evaluated using ImageJ software. Collagen synthesis was compared between groups using the student's t test using the IBM SPSS software. Histologically, the animals submitted to orchiectomy showed variations in the periodontal region, immature alveolar bone and periodontal ligament with the presence of atypical fat cells, in the dental structures, hyperemic pulp with calcification points (nodules) and variation in the arrangement and shape of the odontoblasts, with considerable significance. when compared with the animals of the Sham group. There was no statistically significant difference for collagen synthesis between the groups. It is concluded that the androgen deficit T induces changes in the differentiation of cells that form the tissues of dental and alveolar structures, through the incidence of pulp alterations, presence of atypical cells in the periodontal ligament and delay in the neof ormation of alveolar bone in rats during puberty.

Keywords: Periodontium. Testosterone. Tooth. Pulp.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Divisão entre os grupos experimentais .....	28
Figura 2 - Cirurgia Orquiectomia .....	29
Figura 3 - Sequência de imagens em referência à análise quantitativa de colágeno.....	32
Figura 4 - Fotomicrografias da região de dentina dos incisivos inferiores .....	35
Figura 5 - Fotomicrografias da região de dentina dos incisivos superiores .....	35
Figura 6 - Fotomicrografias da região de polpa dos incisivos inferiores .....	36
Figura 7 - Fotomicrografias da região de polpa dos incisivos superiores .....	37
Figura 8 - Fotomicrografia de corte de osso alveolar mandibular .....	38
Figura 9 - Fotomicrografia do osso alveolar região anterior de maxila .....	39
Figura 10 - Fotomicrografia de corte da região do ligamento periodontal de incisivo inferiores .....	40
Figura 11 - Fotomicrografia processo alveolar da região anterior de maxila .....	41
Figura 12 - Fotomicrografia do ligamento periodontal sob luz polarizada .....	42

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRAFICA</b> .....	14
2.1	CEMENTO .....	14
2.2	LIGAMENTO PERIODONTAL .....	15
2.3	OSSO ALVEOLAR.....	15
2.4	COMPLEXO DENTINA-POLPA.....	16
2.5	ESMALTE .....	18
2.6	TESTOSTERONA.....	19
2.7	TESTOSTERONA E AS ESTRUTURAS DENTOALVEOLARES .....	21
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
3.1	OBJETIVO GERAL .....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
4.1	ASPECTOS ÉTICOS .....	24
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	24
4.8	PROCESSAMENTO HISTOTÉCNICO .....	28
4.9	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA.....	29
4.9.1	<b>Análise Histológica Descritiva e Quantitativa Dos Tecidos Periodontias</b>	<b>29</b>
4.9.2	<b>Análise Histológica Descritiva Das Estruturas Dentárias</b> .....	<b>29</b>
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	31
5	<b>RESULTADOS</b> .....	32
5.1	IMAGENS HISTOLÓGICAS.....	32
5.1.1	<b>Cortes corados em Hematoxilina e Eosina (HE)</b> .....	<b>32</b>
5.1.1.1	<i>Dentina</i> .....	32
5.1.1.2	<i>Polpa</i> .....	32
5.1.1.3	<i>Osso Alveolar</i> .....	34

5.1.1.4	<i>Ligamento Periodontal</i> .....	36
5.1.1.5	<i>Cemento</i> .....	38
5.1.2	<b>Cortes Corados com Pricosirius</b> .....	<b>38</b>
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A testosterona (T) é o hormônio sexual predominante no sexo masculino e responsável pela maturação sexual do indivíduo no período da adolescência, além de estar envolvido em diversos processos fisiológicos, como, principalmente, metabolismo ósseo (MARIOTTI, 1994; MARIOTTI; MAWHINNEY, 2013; MOORADIAN *et al.*, 1987). Algumas condições podem desequilibrar os níveis plasmáticos de testosterona, como condições congênitas ou adquiridas, como diabetes mellitus, obesidade, entre outros e acarretar em disfunção no metabolismo ósseo (GOOREN, 2010; WESPES; SCHULMAN, 2002).

A deficiência de testosterona, também chamada de hipogonadismo, pode ocorrer em qualquer faixa etária e sexo, sendo que a prevalência é maior entre crianças e adolescentes do sexo masculino. Estudos em humanos e animais em demonstrado que as diminuições das concentrações de testosterona podem acarretar em diminuição da densidade mineral óssea (WANG *et al.*, 2016), diminuição da diferenciação de osteoblastos e síntese de colágeno (REIS *et al.*, 2022).

A densidade mineral óssea alveolar está diretamente associada com o movimento dentário ortodôntico, de modo que a redução da densidade óssea, gerada pela deficiência de testosterona, podem aumentar significativamente a velocidade do movimento e também podem influenciar a ocorrência de efeitos indesejáveis, tais como reabsorção radicular (IGLESIAS-LINARES *et al.*, 2016). Na maioria das vezes, a deficiência passa absorto pelo paciente, e o mesmo, quando inicia um tratamento ortodôntico, pode apresentar consequências na região de periodontal e também reabsorção radicular (SALONIA *et al.*, 2019).

A reabsorção radicular é uma das principais sequelas observadas, tanto em relação a deficiência de testosterona (SEIFI *et al.*, 2015), quanto à movimentação dentária, bem como a associação de ambos os fatores, ocorrendo principalmente devido à ativação de células clásticas que reabsorvem os tecidos mineralizados por um mecanismo parecido ao da reabsorção óssea, levando a perda do elemento dentário em casos extremos (BUSATO *et al.*, 2014, ROTHBARTH *et al.*, 2014; KIKUTA *et al.*, 2015).

O colágeno pode ser considerado como o tecido mais abundante e de maior importância para a manutenção do periodonto. Disfunções na estrutura e síntese de

colágeno podem estar diretamente associados com doenças periodontais (MALLIKARJUNAPPA *et al.*, 2021). Estudos indicam que a deficiência de testosterona pode diminuir a síntese de colágeno (REIS *et al.* 2021; REIS *et al.*, 2022).

No campo da medicina, os efeitos da deficiência de testosterona estão, aparentemente, bastante elucidados pela literatura, bem como os efeitos da reposição por esteroides androgênicos. No entanto, estudos indicam que existe uma sensibilidade dos receptores de andrógenos no complexo craniofacial diferente do que no restante do corpo (MÁRQUEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2011). Uma revisão sistemática de Reis *et al.* (2021) demonstrou que a deficiência de testosterona durante a puberdade de animais afeta as estruturas de crescimento craniofacial, diminuindo a proporção dos ossos do crânio e da face. Alguns estudos já foram realizados com o objetivo de avaliar o impacto da testosterona nas estruturas alveolares, periodontais e dentárias (SHAPIRO e SHKLAR, 1962; SCHOUR, 1934; SHKLAR *et al.*, 1967; STEFFENS *et al.*, 2012, 2015; GAETHOFS *et al.*, 1999; ROBERTS *et al.*, 1995; GIRELLI JUNIOR, 2015; GONÇALVES *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2021), entretanto, diversos vieses destes estudos não permitem uma conclusão robusta sobre a temática, além de que apenas Wang *et al.* (2016), Gaethofs *et al.*, (1999) e Roberts *et al.* (1995) avaliaram o impacto da testosterona durante a puberdade.

Ratos e camundongos são os animais mais utilizados para estudos ósseos devido à sua proximidade com a fisiologia humana (GIBBS *et al.*, 2004; MACEDO *et al.*, 2019). Neste contexto, considerando as condições fisiológicas compatíveis com a idade, exige-se do profissional um conhecimento biológico amplo e multidisciplinar, para a elaboração do melhor plano de tratamento evitando efeitos indesejáveis que podem e devem ser previstos durante o tratamento odontológico, seja em virtude de movimento ortodôntico ou tratamento periodontal torna-se necessário que mais estudos sejam realizados com métodos de análises mais modernos e completos, para concluir com propriedade e clareza quanto a influência da testosterona afeta o desenvolvimento das estruturas dentárias e periodontais, levando o cirurgião-dentista a estabelecer protocolos e condutas efetivos e eficazes. Além disso, pouquíssimos estudos já foram realizados sob essa perspectiva, além de que, no melhor do nosso conhecimento, apenas Wang *et al.* (2016), Gaethofs *et al.*, (1999) e Roberts *et al.* (1995) avaliaram estes impactos durante a puberdade, período em que a testosterona tem maiores impactos no metabolismo. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi

avaliar os efeitos da supressão de testosterona em animais no período puberal sobre o desenvolvimento das estruturas dentárias e periodontais.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O periodonto é constituído pelas estruturas que participam da proteção e sustentação dos dentes na maxila e na mandíbula e pode ser dividido em duas regiões:

- 1) periodonto marginal ou de proteção, constituído pela gengiva, que recobre a crista do processo alveolar e estabelece continuidade do epitélio da mucosa oral com o colo do dente pelo epitélio juncional e
- 2) periodonto de sustentação ou inserção, constituído pelo cimento, ligamento periodontal e processo ósseo alveolar, responsáveis pela ancoragem do dente no alvéolo (DI BENEDETTO *et al.*, 2013).

Estas estruturas possuem origem ectomesenquimal, a partir da diferenciação das células do saco ou folículo dentário. Sua função é fixar os dentes nos ossos da maxila e mandíbula. Além disso, funcionam como um sistema para amortecimento das forças mastigatórias para evitar a fratura dos tecidos mineralizados do dente (KATCHBURIAN; ARANA, 2012).

### 2.1 CEMENTO

O cimento é um tecido conjuntivo mineralizado, avascular, que recobre a dentina radicular, tendo como principal função a inserção das fibras do ligamento periodontal na raiz do dente. É constituído por 60% de mineral (principalmente cristais de hidroxiapatita) e 40% de matriz orgânica, constituída majoritariamente por colágeno do tipo I. A espessura do cimento é variável sendo mais fino no terço cervical da raiz, aumentando gradualmente em direção apical (KATCHBURIAN; ARANA, 2012). Estruturalmente pode ser dividido em: cimento acelular de fibras extrínsecas, encontrado na porção cervical de todos os dentes e cimento celular, de fibras mistas (extrínsecas e intrínsecas), que recobre a porção apical da raiz, sendo caracterizado pela presença de células (cementócitos) em lacunas no interior da matriz (FOSTER, 2012). Acredita-se que a principal função do cimento celular esteja relacionada com movimentação dental pós-eruptiva e adaptação à oclusão (FOSTER, 2012), atuando também em processos de reparo em regiões de fratura ou reabsorção radicular

(NANCI; BOSSHARDT, 2006). Por outro lado, o cimento acelular exerce um papel crítico na fixação das fibras do ligamento periodontal. Estudo demonstra que falhas no processo de cementogênese acelular estão relacionadas à uma fraca inserção das fibras colágenas do ligamento periodontal no cimento, podendo levar ao desenvolvimento da doença periodontal (FOSTER *et al.*, 2013).

## 2.2 LIGAMENTO PERIODONTAL

O ligamento periodontal (LP) é um tecido conjuntivo frouxo, caracterizado por grossos feixes de colágeno que se inserem no cimento e no processo ósseo alveolar, estabelecendo desta maneira, a articulação entre o dente e seu alvéolo. É constituído por uma heterogênea população celular que incluem fibroblastos, que são responsáveis pela remodelação e renovação (turnover) dos componentes da matriz extracelular, osteoblastos, osteoclastos, restos de células epiteliais de Malassez, monócitos, macrófagos, células mesenquimais indiferenciadas, cementoblastos e odontoclastos (CHO; GARANT, 2000). A região preenchida pelo LP é conhecida como espaço periodontal. A espessura do ligamento periodontal varia de acordo com a região ao longo da raiz do dente e a idade, apresentando uma diminuição com o envelhecimento (KATCHBURIAN; ARANA, 2012). O ligamento periodontal forma-se à medida que o dente se desenvolve e irrompe na cavidade oral, e sua estrutura não se completa até que o dente entre em oclusão e seja aplicada a força funcional (TEN CATE, 2001). A principal função do LP é amortecer as forças mastigatórias e por meios de seus receptores sensoriais e proprioceptivos, desempenha importante papel na acomodação dos arcos dentários durante os movimentos funcionais mastigatórios do sistema estomatognático. Além disso, devido à presença de células indiferenciadas, o LP tem uma participação importante na homeostasia, regeneração e reparo dos tecidos periodontais (XIAU; NASU, 2014).

## 2.3 OSSO ALVEOLAR

O osso alveolar é a porção de tecido ósseo da maxila e da mandíbula que delimita o alvéolo dentário no qual o dente está alojado e fixado por meio das fibras do ligamento periodontal. Desta forma constitui uma verdadeira articulação que permite resistir às forças geradas pelo contato intermitente dos elementos dentários

durante a mastigação, fonação e deglutição. É um tecido conjuntivo mineralizado constituído por 60% de substâncias minerais (principalmente cristais de hidroxiapatita), 20% de matriz orgânica, caracterizada principalmente por colágeno I e 20% de água (FERRARIS; MUNHOZ, 2006). A estrutura óssea é formada, mantida e remodelada pela ação de três células principais: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Essas células estão presentes na superfície das trabéculas ósseas do osso esponjoso, superfície externa e interna do osso cortical e inseridos no próprio osso. Os osteoblastos produzem a matriz orgânica (osteóide) que sofre posterior calcificação. Durante o processo de maturação e calcificação do osteóide, alguns osteoblastos são aprisionados transformando-se em osteócitos. Os osteócitos alojados nas lacunas do osso calcificado ligam-se entre si e com osteoblastos da superfície óssea por meio de prolongamentos citoplasmáticos que estão presentes em canaliculos. Já os osteoclastos estão nas superfícies ósseas e são responsáveis pela degradação da matriz óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). De uma maneira geral, os mecanismos reguladores de formação, remodelação e reabsorção óssea alveolar são os mesmos que controlam o tecido ósseo do restante do organismo. Entretanto, destaca-se que no osso alveolar o turnover ocorre muito mais rapidamente e o tecido é totalmente reabsorvido na ausência do dente (FERRARIS; MUNHOZ, 2006).

A homeostasia dos tecidos periodontais envolve uma rede complexa, multifatorial na qual, pelo menos em parte, os hormônios sexuais esteroides exercem importantes funções, tanto em processos fisiológicos quanto patológicos (MARIOTTI; MAWHINNEY, 2013). Dentre os hormônios sexuais esteroides que exercem importante função na regulação e manutenção dos tecidos periodontais destaca-se a testosterona (MARIOTTI, 1994).

#### 2.4 COMPLEXO DENTINA-POLPA

A polpa dentária é constituída por um tecido conjuntivo frouxo, semelhante ao de outras partes do organismo, envolvido pelo tecido dentinário. Os odontoblastos, células presentes na superfície pulpar, são responsáveis pela formação da dentina e também fazem parte da sua estrutura. A íntima relação entre estes dois tecidos permite a formação de um complexo dentina-polpa ou dentina-pulpar (ESTRELA, 2007; YU; ABBOTT, 2007).

A dentina é a porção de tecido duro do complexo dentina-polpa e constitui o maior volume do dente. Seu componente inorgânico consiste, principalmente, em hidroxiapatita, e a fase orgânica em colágeno tipo I com inclusões fracionais de glicoproteínas, proteoglicanos e fosfoproteínas. Caracteriza-se pela presença de múltiplos túbulos dentinários atravessando toda a sua estrutura e contendo extensões citoplasmáticas dos odontoblastos (TEN CATE, 1998).

A localização anatômica do tecido pulpar influencia suas reações fisiológicas, por estar circundado por dentina mineralizada. A polpa convive assim, com momentos críticos, pois apresenta limitada capacidade de se expandir durante a vasodilatação. Considerando que o substrato nutricional provém da vascularização, que atravessa os pequenos forames e foraminas, o tecido pulpar encontra-se num ambiente de baixa tolerância (ESTRELA, 2007).

O tecido pulpar é composto de um material gelatinoso, de consistência viscosa, denominado de matriz extracelular. Composto essa matriz existem os proteoglicanos e glicoproteínas, entrelaçados a feixes de fibras colágenas, funcionando como uma barreira à disseminação de irritantes e produtos tóxicos (ESTRELA, 2007; YU; ABBOTT, 2007).

As principais células pulpares são as de defesa, fibroblastos, as ectomesenquimais e odontoblastos (ESTRELA, 2007). As células ectomesenquimais, são células tronco multipotentes, capazes de se diferenciar no interior de tecidos mesenquimais e não mesenquimais, em tecido adiposo, ósseo, cartilaginoso e nervoso (PERRY *et al.*, 2008). A presença de células ectomesenquimais na polpa dental foi proposta por Fitzgerald *et al.*, 1990. Eles relataram a presença de células semelhantes a fibroblastos, capazes de se diferenciar em odontoblastos, após agressão ou trauma que levavam à sua morte prematura.

Histologicamente, a polpa é dividida em quatro zonas: (1) camada de odontoblastos na periferia da polpa; (2) camada acelular de Weil abaixo dos odontoblastos, proeminente na polpa coronária; (3) camada rica em células, com densidade celular elevada, na polpa coronária, adjacente à camada acelular; (4) centro da polpa, caracterizado por vasos e nervos maiores da polpa (TEN CATE, 1998).

Na polpa dentária existem três características únicas de anastomoses: arteriovenosas, vênula-vênula e arteríolas que tem uma forma da letra U. À medida que a pressão intrapulpar aumenta (o que diminui o fluxo sanguíneo), durante o

processo inflamatório, esses vasos em anastomose podem se abrir no esforço de diminuir a pressão intrapulpar e manter o fluxo normal. Acredita-se que esse sistema existe pra manter a circulação pulpar sob determinadas condições de agressão (TEN CATE, 1998; YU; ABBOTT, 2007).

A inervação pulpar segue o trajeto dos vasos sanguíneos, constituindo-se de fibras nervosas sensoriais, originárias de ramificações do nervo trigêmeo. Os feixes nervosos que entram pelo forame apical direcionam-se a porção coronária. Partindo desse plexo, saem fibras nervosas que penetram na pré dentina, como uma alça, e saem novamente para ingressar no plexo (TEN CATE 1998; ESTRELA, 2007; YU; ABBOTT, 2007; ELMEGUID; YU 2009)

Os odontoblastos são células pós mitóticas, diferenciadas, eminentemente pulpares, responsáveis pela síntese da matriz orgânica da dentina. Revestem a polpa dentária, desenvolvendo 16 prolongamentos ao redor dos quais se forma a dentina. São colunares na altura dos cornos pulpares, diminuindo de tamanho à medida que vão aproximando-se da região cervical, tornando-se cúbicas na raiz e achatadas no ápice radicular. São mais ativos na porção coronária que na porção radicular (ESTRELA, 2007). Possuem também a função de transdução sensorial. Essas células comunicam-se umas com as outras por meio de junções firmes e aderentes, as junções GAP. Assim, se um odontoblasto é afetado os outros também serão; por exemplo, frente a uma agressão, o deslocamento do fluido dentinário no interior dos túbulos ativa mecanorreceptores presentes nos axônios das fibras nervosas sensoriais (YU; ABBOTT, 2007).

Após a dentinogênese primária, os odontoblastos permanecem funcionais produzindo dentina secundária fisiológica e dentina terciária tubular, como resposta a um estímulo de intensidade moderada. No entanto, uma agressão maior poderia levar à sua morte e, conseqüentemente, perda do potencial de reparo do tecido pulpar (SMITH *et al.*, 1995).

## 2.5 ESMALTE

O esmalte é uma estrutura altamente mineralizada e considerada a mais dura do corpo humano devido ao alto conteúdo de cristais de fosfato de cálcio ou bastões altamente compactados que se organizam para formar os prismas de esmalte

(AVERY *et al.*, 2005; ARNOLD; GAENGLER, 2007). Além disso, o esmalte dental apresenta uma matriz orgânica extracelular (também denominada substância interprismática) que circunda os prismas e tem características morfológicas totalmente diferentes dos prismas em relação ao volume, orientação morfológica e composição química. A matriz orgânica do esmalte representa apenas 4%, em termos de peso, da estrutura do esmalte e é constituída por água e proteínas de natureza não colagenosa como amelogenina, ameloblastina e enamulina encontradas em pequenas quantidades nos espaços interprismáticos (NANCI, 2008).

## 2.6 TESTOSTERONA

A testosterona (T) é o principal androgênio circulante nos homens, sendo produzida e secretada, na sua maior parte (aproximadamente 95%), pelas células de Leydig nos testículos e, em menor quantidade, pelas glândulas adrenais, que contribuem com menos de 5% da produção de T. Estima-se que apenas 2 a 3% da T circulante encontra-se disponível em sua forma livre (KAUFMAN; VERMEULEN, 2005).

A regulação da produção de T em homens eugonadais depende do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HPG). O hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que age sobre a hipófise anterior estimulando-a a produzir o hormônio folículo-estimulante (FSH), que atua sobre as células de Sertoli, localizadas no interior dos túbulos seminíferos, e o hormônio luteinizante (LH), que atua sobre as células intersticiais de Leydig dos testículos, estimulando-as a produzirem a T (BAGATELL; BREMNER, 1996; COSTANZO, 2006). O eixo HPG é regulado por um mecanismo de feedback negativo onde a T inibe a frequência e amplitude da liberação de GnRH a partir do hipotálamo, e também a secreção de LH pela hipófise (DANDONA; ROSENBERG, 2010).

A função da T, juntamente com a programação genética do indivíduo, no organismo masculino se inicia durante a gestação e está relacionada no desenvolvimento dos órgãos reprodutores. Após esse período ela cessa, e irá atuar na puberdade de forma mais exacerbada, realizando o término do desenvolvimento e manutenção dos órgãos reprodutivos e das características sexuais secundárias, principalmente no tecido ósseo, produzindo ossos mais longos e com maior proporção de massa cortical óssea, quando comparado com mulheres. Além disso, atua no

tecido muscular também, produzindo característica resultante no dimorfismo sexual, além do controle das funções reprodutivas e da fertilidade (VANDERSCHUEREN *et al.*, 2004).

A testosterona (T) começou a ser avaliada, além do seu papel na reprodução e manutenção do sistema reprodutivo, no seu papel de regulação e metabolismo do tecido ósseo, funcionamento e regulação do coração, rins, músculos esqueléticos, sistema imunológico, glândulas salivares, e tecidos orais (MOORADIAN *et al.*, 1987; MARIOTTI, 1994; MARIOTTI; MAWHINNEY, 2013).

A ação androgênica da testosterona nos diferentes órgãos-alvos ocorre por três vias principais:

- 1) diretamente através da ligação do hormônio aos receptores de andrógenos (AR), como ocorre no músculo;
- 2) após 5 $\alpha$ -redução da T à diidrotestosterona (DHT), pela ação da enzima 5 $\alpha$ reductase, como ocorre na próstata e
- 3) através da aromatização da T para estradiol, pela ação da enzima aromatase nos tecidos alvos, e da ligação do estradiol aos receptores de estrógeno (Ers), como ocorre por exemplo no tecido-ósseo (MOORADIAN *et al.*, 1987; VANDERSCHUEREN *et al.*, 2004).

É bem estabelecido na literatura científica que as concentrações de Testosterona nos homens diminuem com a idade (HARING *et al.*, 2010; ZIRKIN; TENOVER, 2012). Especificamente, a partir dos 40 anos ocorre, em média, uma diminuição de 1-2% das concentrações de testosterona total. Aos 75 anos, a concentração plasmática do hormônio corresponde a aproximadamente dois terços da concentração de testosterona aos 25 anos de idade (KAUFMAN; VERMEULEN, 2005).

Entretanto, além do envelhecimento, condições como diabetes mellitus, obesidade, síndrome metabólica, hipertensão arterial e influências do estilo de vida (uso de álcool, tabaco e estresse psicológico) podem estar fortemente associados à diminuição de T no homem. Os principais sintomas associados ao hipogonadismo são diminuição da libido, disfunção erétil, diminuição da fertilidade, obesidade, alterações no humor, fadiga, depressão, diminuição da força e da massa muscular, diminuição

da densidade mineral óssea e prejuízo da qualidade de vida (WESPES; SCHULMAN, 2002; GOOREN, 2010).

Estudos em humanos e animais tem demonstrado que a diminuição das concentrações de testosterona é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (SVARTBERG *et al.*, 2004), inflamação (HARING *et al.*, 2012), hipertensão (TORKLER *et al.*, 2011), síndrome metabólica (CHOUDHURY *et al.*, 2013), diabetes tipo 2 (SCHIPF *et al.*, 2011), doença periodontal (DALTABAN *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2011) e diminuição da densidade mineral óssea (WANG *et al.*, 2016).

A deficiência de andrógeno acelera o *turnover* ósseo e causa um desbalanceamento entre reabsorção e remodelação óssea (LEROUXEL *et al.*, 2004). A densidade mineral e óssea das porções trabecular e cortical do osso aparentemente são sensíveis à manutenção homeostática do Receptor de Andrógeno concomitantemente com os níveis sorológicos de testosterona disponíveis no sangue (WU *et al.*, 2019b).

## 2.7 TESTOSTERONA E AS ESTRUTURAS DENTOALVEOLARES

Estudos demonstram que tanto as estruturas dentárias quanto periodontais são sensíveis à testosterona, uma vez que as células destas regiões possuem em suas membranas plasmáticas o Receptor de Andrógeno (INABA *et al.*, 2013; RODRIGUEZ *et al.*, 2013; HOUARI *et al.*, 2016; JEDEON *et al.*, 2016). Além disso, os estudos evidenciam também o papel direto da testosterona sobre a diferenciação de células indiferenciadas em osteoblastos, odontoblastos e fibroblastos. Uma vez que a testosterona age diretamente na diferenciação de células cruciais para o desenvolvimento das estruturas dentoalveolares, é plausível assumir que o desenvolvimento destas estruturas durante a puberdade é significativamente afetado por disfunções de testosterona. De fato, estudos com adolescentes já demonstram o impacto da testosterona sobre o desenvolvimento dentário e esquelético (GAETHOFS *et al.*, 1999; ROBERTS *et al.*, 1995). Nenhum estudo investigou em humanos o impacto da testosterona sobre o ligamento periodontal.

Estudos com animais intentam inferir com maiores propriedades os mecanismos impactados pela alteração dos níveis plasmáticos de testosterona. Os estudos relataram uma diminuição no número e na atividade das células do ligamento

periodontal (SHAPIRO e SHKLAR, 1962; SHKLAR *et al.*, 1967; SCHOUR, 1934) perda de inserção óssea e aumento de inflamação (STEFFENS *et al.*, 2012; 2015; GONÇALVES *et al.*, 2018). Wang *et al.* (2016) investigou a morfologia de caninos de macacos orquiectomizados e demonstrou que estes possuíam menor área e com cúspides menos intactas comparados aos caninos de macacos do grupo controle.

É necessário salientar alguns vieses destes estudos que investigaram o impacto da testosterona sobre as estruturas dentoalveolares: Alguns destes realizaram a remoção da hipófise para avaliar o papel da testosterona (SHAPIRO e SHKLAR, 1962; SCHOUR, 1934; SHKLAR *et al.*, 1967), e não a orquiectomia. Mohamad *et al.* (2016) afirmam que a técnica mais comum e mais segura para a supressão em animais continua sendo a orquiectomia, apesar da castração química emergir na literatura. A remoção da hipófise pode demonstrar efeitos que não são exclusivos da deficiência de testosterona, já que a glândula controla a produção de outros hormônios. Além disso, apenas Wang *et al.* (2015) investigou os efeitos sobre o dente de macacos durante a puberdade, e nenhum observou os impactos do ligamento periodontal durante a puberdade, a maioria avaliou os impactos durante a vida adulta. O impacto da deficiência da testosterona sobre a síntese de colágeno no periodonto também não foi investigado. Apenas dois estudos com humanos foram realizados, e avaliaram a idade dentária e esquelética tanto de adolescentes com atraso e adiantamento da puberdade (GAETHOFS *et al.*, 1999; ROBERTS *et al.*, 1995).

### 3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram os seguintes:

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo é realizar uma investigação em animais a fim de avaliar o papel da deficiência de androgênio (testosterona) durante a puberdade nas alterações fenotípicas histológicas do desenvolvimento das estruturas dentárias e periodontais.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar os tecidos do complexo dentina-polpa e do periodonto de sustentação identificando diferenças entre os grupos deficiência e controle;
- b) Comparar a síntese de colágeno do ligamento periodontal entre os grupos deficiência e controle.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo faz parte de uma ampla linha de pesquisa iniciada por Reis *et al.* (2022). O guideline PREPARE (Planning Research and Experimental Procedures on Animals: Recommendations for Excellence) (SMITH *et al.*, 2018), e a ferramenta SYRCLE'S (HOOIJMANS *et al.*, 2014) foram utilizadas para o desenho deste estudo. Para a escrita científica desta dissertação, o guideline ARRIVE (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments) foi seguido (KILKENNY *et al.*, 2010).

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Os procedimentos envolvendo modelo animal foram previamente submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas, a qual aprovou este projeto sob número de protocolo 024/2019 conforme anexo (ANEXO A). Duas veterinárias foram consultadas previamente para esclarecimento de todos os aspectos pertinentes ao bem estar animal, bem como medicações e posologia. Foram seguidas todas as recomendações de instituições reconhecidas para o bem-estar animal.

### 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi utilizada uma fórmula segundo Miot (2011) para o cálculo de tamanho de amostra para comparação de uma hipótese em dois grupos ou mais. O tamanho de efeito D de Cohen foi obtido dos resultados de Omori *et al.*, 2021. Sob um alfa = 0,05 e beta = 0,80, obteve-se o resultado de 7 animais por grupo. Após a orquiectomia, os animais poderiam sofrer de hipotermia e infecções decorrentes da cirurgia e cerca de 20% deles poderão vir a óbito decorrente dessas complicações (IDRIS, 2012). Por isso, fez-se necessário acrescentar mais dois animais por grupo, totalizando 9 animais por grupo (n=36).

### 4.3 ANIMAIS

Ratos heterogênicos machos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar* obtidos no Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

foram selecionados para este estudo. Esta espécie é bem aceita em pesquisas ósseas devido ao seu nível de proximidade com a fisiologia humana (GIBBS *et al.*, 2004; MACEDO *et al.*, 2019). Os animais foram obtidos no dia do desmame (21 dias). Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Anatomia da mesma instituição onde permaneceram alojados durante toda a experimentação.

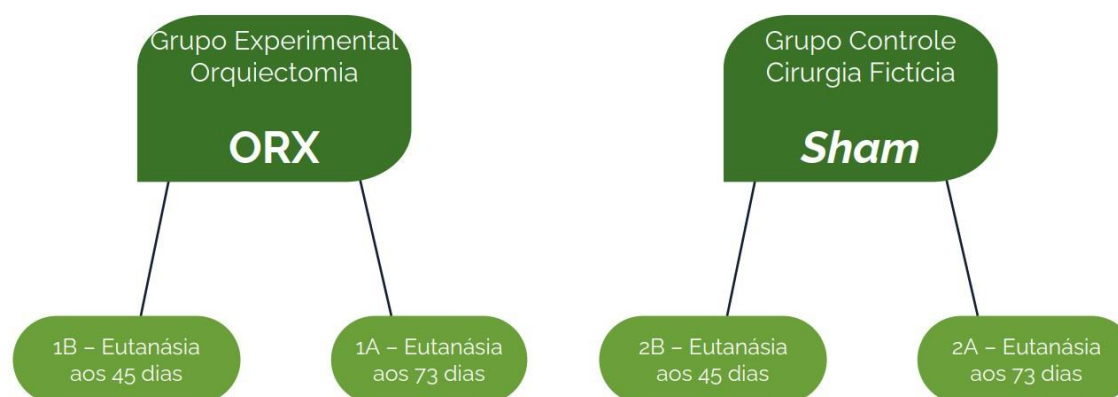
#### 4.4 CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO E ALIMENTAÇÃO

Três animais permaneciam em cada caixa de polipropileno de dimensões de 49x34x16 forrados com maravalha. Os animais tinham livre acesso a ração e água filtrada sob temperatura controlada entre 21° a 23° celsius com exaustão do ar e dentro um ciclo de 12 horas claro-escuro. Os animais não foram aleatoriamente alojados para evitar perdas por lesões por mordedura (BROWN, 1986; KOOLHAAS, 2010; CENTRAL MICHIGAN UNIVERSITY, 2013).

#### 4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram aleatoriamente alocados por um pesquisador que não realizou as cirurgias em dois grandes grupos: Orquiectomia (ORX) e Cirurgia Fictícia (*Sham*). Ambos os grupos foram divididos em mais dois grupos: um grupo que seria eutanasiado aos 45 dias de vida (período de surto puberal) e outro grupo que seria eutanasiado aos 73 dias de vida (período pós-puberal) (FIGURA 1). Em ratos *Wistar* machos, a descida dos testículos ocorre próximo ao 15° dia de vida, e a puberdade se inicia aproximadamente no 35° dia (OTTO *et al.*, 2015). Segundo Lee *et al.* (1975), a partir do 26° dia de vida, em média, já ocorre uma discreta, mas significativa, produção de testosterona pelos testículos. Sendo assim, os procedimentos experimentais foram realizados no 23° dia de vida do animal para que a testosterona não influenciasse sob nenhuma hipótese a puberdade do animal.

Figura 1 – Fluxograma de alocação de animais



Fonte: Da autora (2022)

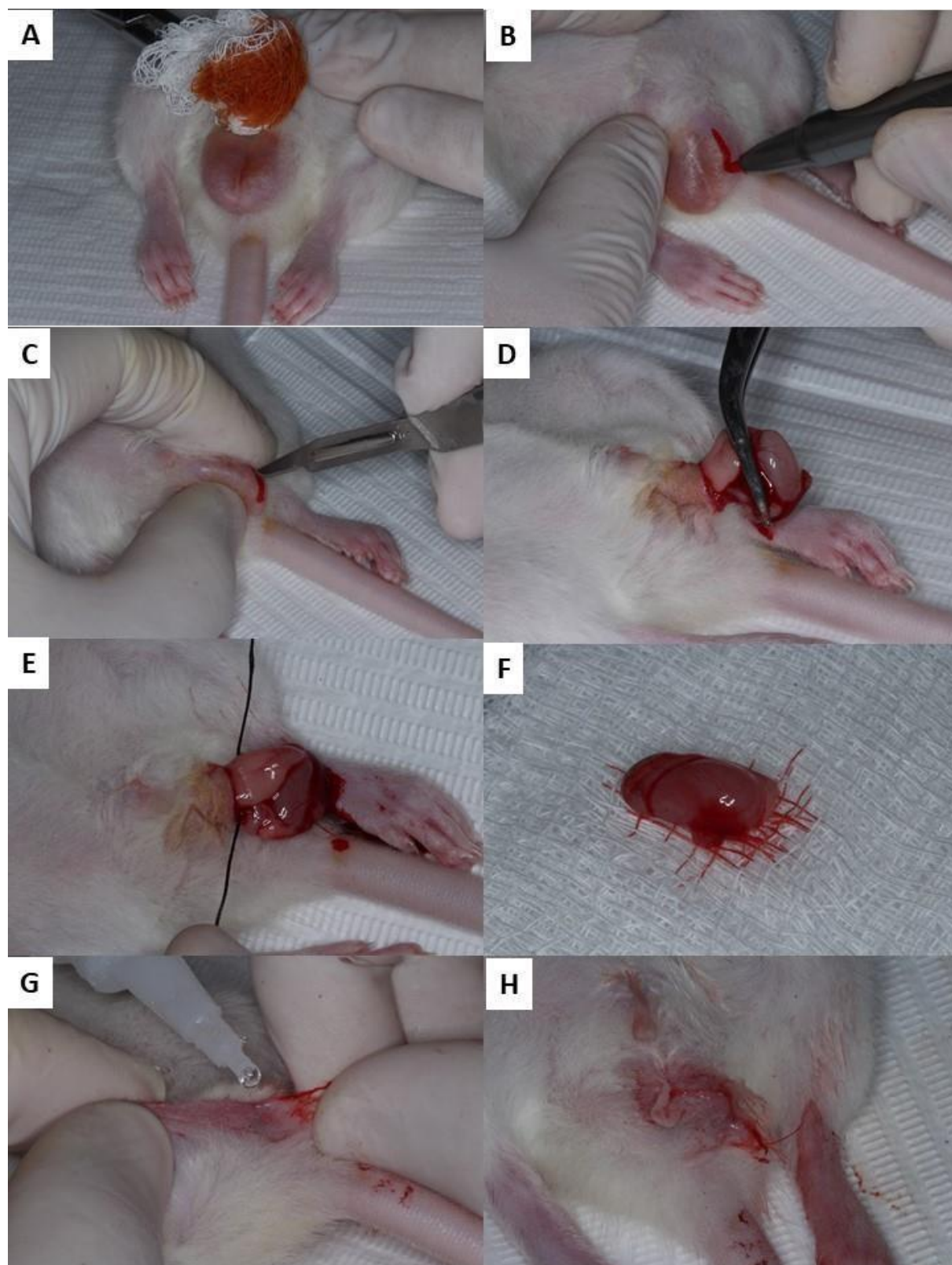
#### 4.6 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Para a indução da supressão de testosterona, o procedimento no grupo experimental foi a orquiectomia, que é a remoção dos dois testículos e epidídimos. A orquiectomia é o método mais seguro e eficaz para a supressão de testosterona, que demonstra afetar diretamente os níveis sorológicos desse hormônio durante a puberdade (VERDONCK *et al.*, 1998<sup>a</sup> e 1998<sup>b</sup>; FUJITA *et al.*, 2004; MOHAMAD *et al.*, 2016). O grupo controle recebeu uma cirurgia fictícia. Essa cirurgia reproduziu anestesia, estresse cirúrgico, incisão e síntese dos tecidos moles para ajuste de fatores de confusão. Um único operador previamente treinado por veterinária e que não participou do processo de alocação dos animais realizou os procedimentos.

##### 4.6.1 Orquiectomia

Os animais foram submetidos à anestesia por meio de injeção intraperitoneal com Cloridrato de Ketamina 10% (55 mg/Kg de peso corporal) e Xilazina 2% (5 mg/Kg de peso corporal). A orquiectomia foi realizada conforme protocolado por Idris (2012). Primeiramente, limpeza e antissepsia da região cirúrgica foi realizada com solução de PVPI 10%. Uma incisão em cada lado do escroto foi realizada com lâmina de bisturi até a exposição dos testículos. Foi realizada ligadura com um fio de seda, 4,0 mm, na região dos vasos deferentes e sanguíneos antes da remoção cirúrgica dos testículos e epidídimos. O restante do conteúdo testicular foi reinserido no escroto, e a síntese do tecido mole foi realizada com adesivo a base de cianoacrilato (FIGURA 2). Após a

Figura 2 – Sequência da Orquiectomia.



Fonte: Adaptado de REIS, 2021.

Legenda: A) Antissepsia. B) Linha de orientação à incisão. C) Incisão. D) Extravasamento do conteúdo testicular. E) Ligadura dos vasos. F) Testículo removido. G) Síntese do tecido mole. H) Aspecto Final.

Cirurgia, foi administrado Tramadol (12,5 mg/kg intramuscular) para analgesia pós-cirúrgica, de 12h/12h por um dia. Os ratos foram observados durante esse período.

#### 4.6.2 Cirurgia *Sham*

Os animais do grupo controle foram submetidos a cirurgias fictícias (*sham*), onde os testículos foram apenas movimentados e devolvidos intactos à posição original. A incisão e síntese dos tecidos, bem como anestesia e analgesia, também foram reproduzidos neste grupo

#### 4.7 EUTANÁSIA

A eutanásia dos animais foi realizada por inalação de isoflurano. A morte do animal foi confirmada após a interrupção dos movimentos respiratórios e musculares.

#### 4.8 PROCESSAMENTO HISTOTÉCNICO

As regiões dos incisivos centrais superiores e inferiores foram cuidadosamente seccionadas e separadas para processamento histotécnico, fixados por imersão em formol tamponado a 10%, em temperatura ambiente, por 24 horas. Decorrido este período, as peças foram lavadas em água corrente, por 4 horas, e submetidas ao processo de desmineralização, por meio de imersão em solução à base de EDTA a 4,13% (pH 7 – 7.4). Após 60 dias de desmineralização, as peças foram submetidas ao processamento histotécnico de rotina e passaram pelos processos de desidratação em álcool de concentrações crescentes (70%, 80% e 95% por 45 minutos cada e 3 trocas de álcool 100% por 45 minutos cada), álcool/xilol por 30 minutos, diafanização em xilol (xilol I, II e III por 40 minutos cada) e inclusão em parafina. Os blocos contendo os tecidos foram cortados longitudinalmente em micrótomo (Leica RM2145; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha). Cortes semi-seriados de 7µm foram obtidos em toda a extensão da peça. Os cortes de cada grupo foram corados com hematoxilina e eosina (HE), e *Picro Sirius Red* e submetidos à análise em microscopia óptica convencional, no microscópio Axio Imager.M1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha), com câmera AxioCam MRc5 acoplada (Carl Zeiss

MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha, para descrição das características dos tecidos dentários e periodontais. Filtro para luz polarizada foi inserida no microscópio para as imagens em picosírius. As imagens foram capturadas utilizando objetiva de até 40X.

#### 4.9 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

Foi realizada uma análise descritiva e quantitativa das lâminas histológicas, para a verificação de possíveis alterações nos tecidos periodontais e das estruturas dentárias

##### 4.9.1 Análise Histológica Descritiva e Quantitativa Dos Tecidos Periodontias

A análise descritiva priorizou os seguintes aspectos:

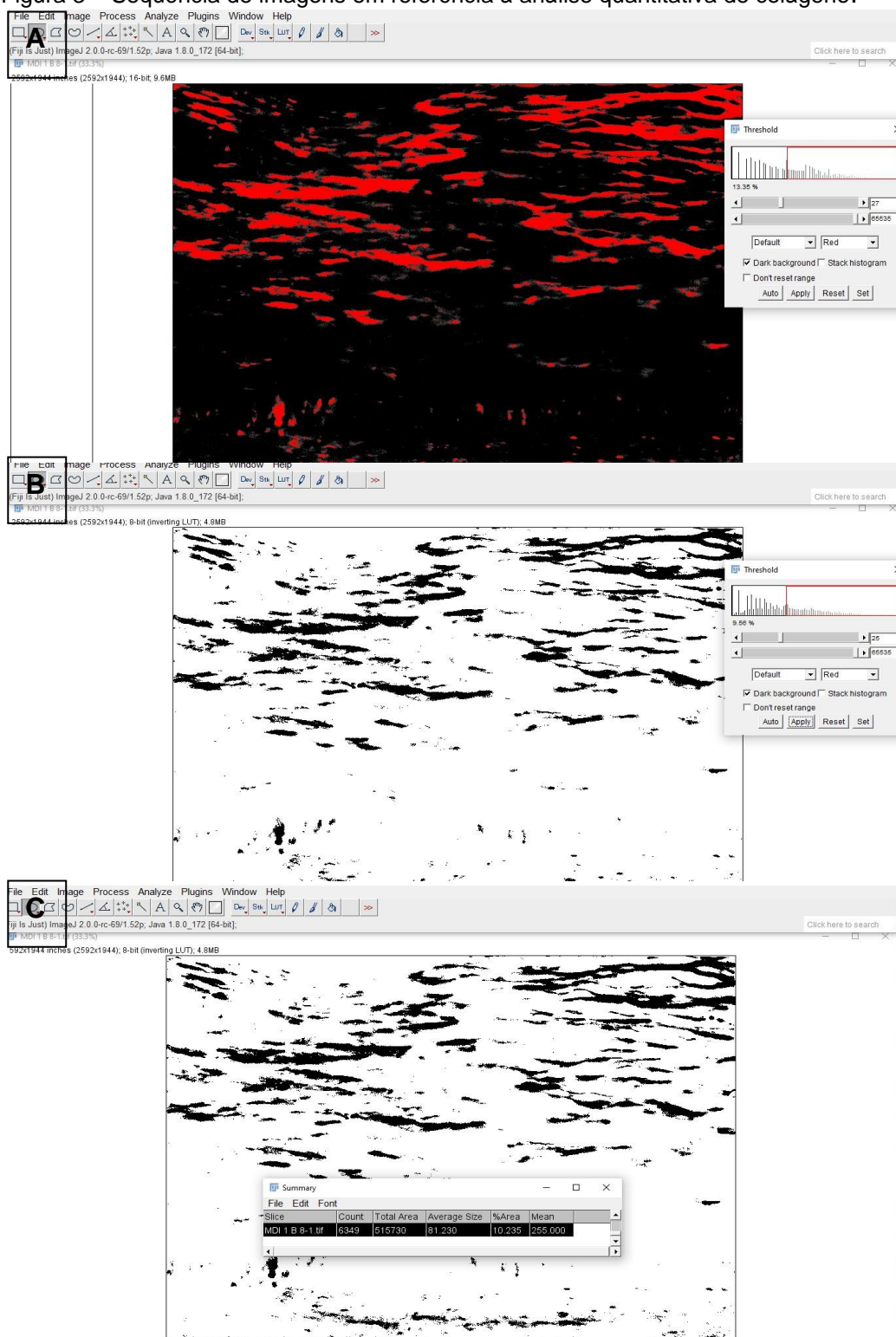
- a) Estrutura histológica do ligamento periodontal: presença de fibroblastos, arranjo e orientação das fibras colágenas, presença de infiltrado inflamatório;
- b) Estrutura histológica do osso alveolar ao redor da raiz, presença de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, presença de infiltrado inflamatório, presença de absorções e neoformações e
- c) Estrutura histológica do cimento: arranjo, continuidade e quantidade.

Para análise quantitativa da síntese de colágeno, os cortes que compreenderam o comprimento total da raiz do incisivo inferior foram selecionados. Imagens sob objetiva de 40x foram obtidas na região média da raiz dos dentes inferiores, com uma faixa de cimento como referência. A análise quantitativa da síntese de colágeno foi realizada através do software ImageJ. Após o reconhecimento das áreas de alta birrefringência das imagens sob luz polarizada, que correspondem ao colágeno, o software quantificou a área de colágeno sintetizado em pixels e indicou a porcentagem em relação a área total da imagem (FIGURA 3).

##### 4.9.2 Análise Histológica Descritiva Das Estruturas Dentárias

Foi realizada uma análise descritiva das lâminas histológicas, para a verificação de possíveis alterações nos tecidos das estruturas dentárias:

Figura 3 – Sequência de imagens em referência à análise quantitativa de colágeno.



Fonte: Da autora (2022)

Legenda: A: Reconhecimento das áreas de alta birrefringência (colágeno). B: Isolamento das áreas de colágeno do restante da imagem. C: Quantificação em pixels da área de colágeno e porcentagem em relação à área total da imagem.

- a) Estrutura histológica da polpa: grau de vascularização, qualidade e quantidade de fibroblastos, fibras colágenas, presença de infiltrado inflamatório.
- b) Estrutura histológica da dentina: tipo de dentina apresentada, quantidade, qualidade, forma e arranjo de odontoblastos.
- c) Estrutura histológica do esmalte: qualidade e quantidade de ameloblastos, arranjo e continuidade.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Por se tratar de um dado composicional, as porcentagens das áreas de colágeno nas imagens foram submetidas à transformação  $\log_{10}$  e, assim, comparadas pelo teste t de student pelo software IBM SPSS. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 5 RESULTADOS

Sete animais não completaram o experimento devido às complicações na anestesia (n=5), e lesões por mordedura (n=2).

### 5.1 IMAGENS HISTOLÓGICAS

As observações das imagens histológicas a seguir foram divididas por coloração e região anatômica.

#### 5.1.1 Cortes corados em Hematoxilina e Eosina (HE)

Análises entre grupos ORX e Sham são relatadas conforme a região estudada.

##### 5.1.1.1 *Dentina*

As dentinas de ambos os grupos e tempos experimentais foram observadas com padrão de normalidade com túbulos dentinários dispostos simetricamente ao longo de toda estrutura. Em toda extensão da dentina, encontrou-se uma delgada região não mineralizada, aderida aos odontoblastos denominada pré-dentina.

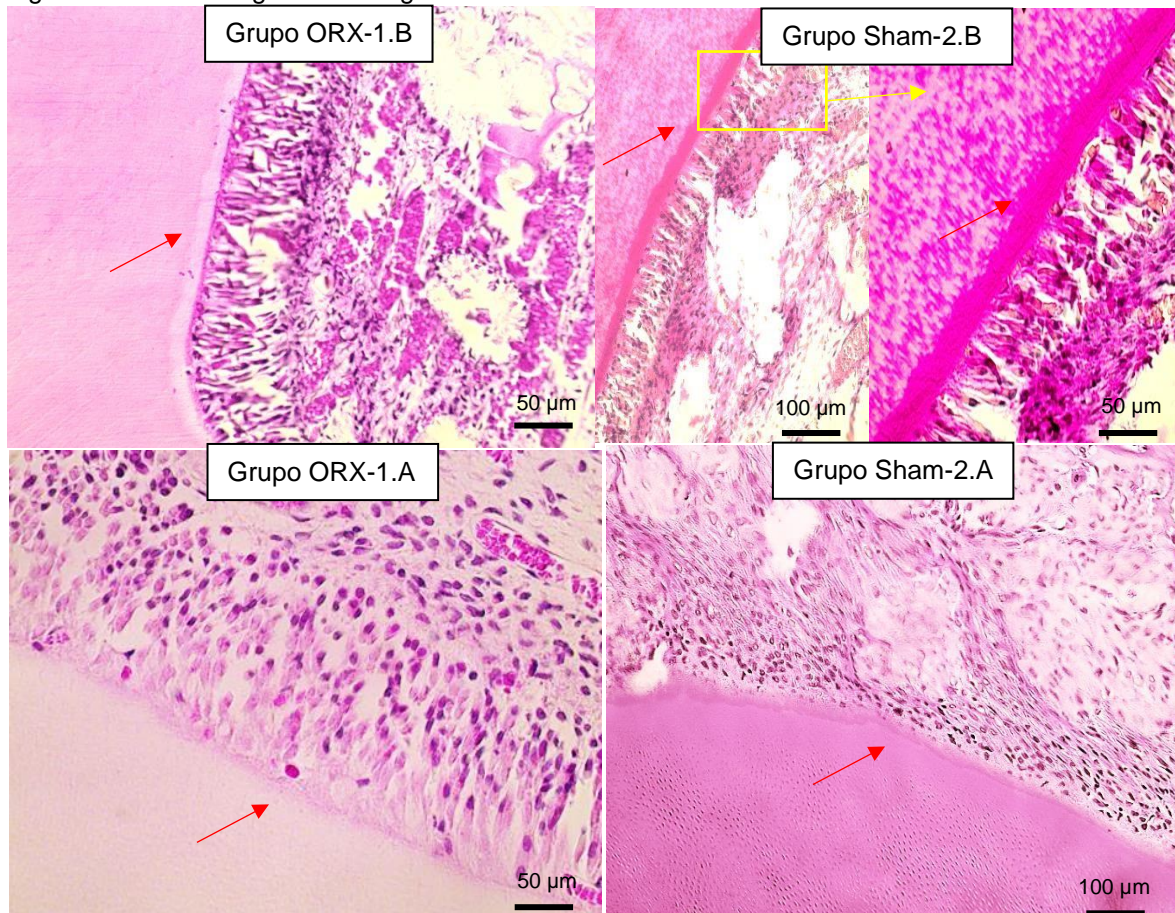
Na interface da pré-dentina/dentina dos incisivos inferiores, o grupo ORX-1.A, apresentou uma frente de mineralização histometricamente menor em quantidade e espessura quando comparado ao grupo Sham-2.A. Entretanto, não observou diferenças entre os Grupo ORX-1. B e Sham-2. B (FIGURA 4).

Entretanto, não foi observado diferenças na estrutura da dentina dos incisivos superiores. Ambos os grupos apresentavam dentina com aspecto normal, túbulos dentinários dispostos em paralelos percorrendo da extensão da dentina, e odontoblastos numerosos dispostos ao longo da pré-dentina. Ambos os grupos apresentam ameloblastos em grande número e com aspecto morfológico normal (FIGURA 5).

##### 5.1.1.2 *Polpa*

As polpas dentárias dos incisivos inferiores no grupo ORX-1. A apresentaram

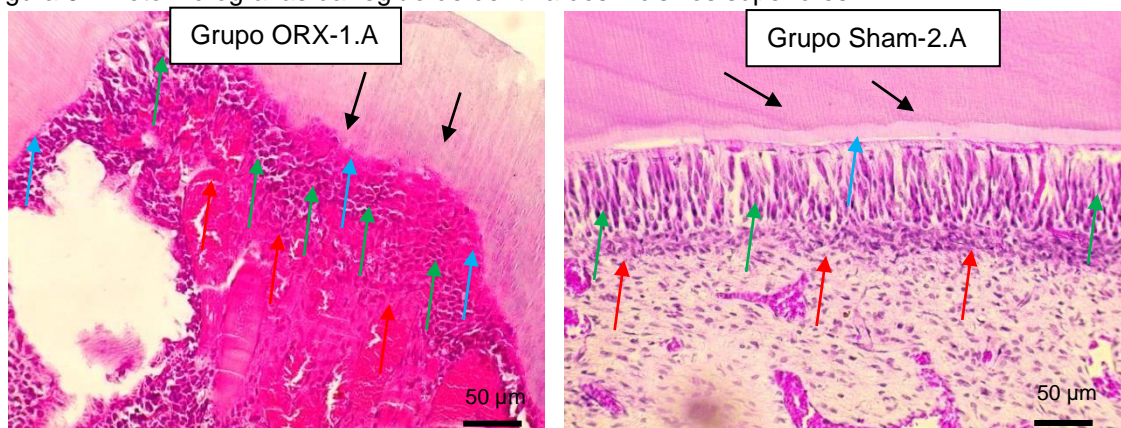
Figura 4 – Fotomicrografias da região de dentina dos incisivos inferiores.



Fonte: Da autora (2022)

Legenda: As setas vermelhas indicam uma camada de matriz não mineralizada presente em toda a extensão da dentina, aderida aos odontoblastos, e denominada pré-dentina.

Figura 5 – Fotomicrografias da região de dentina dos incisivos superiores.



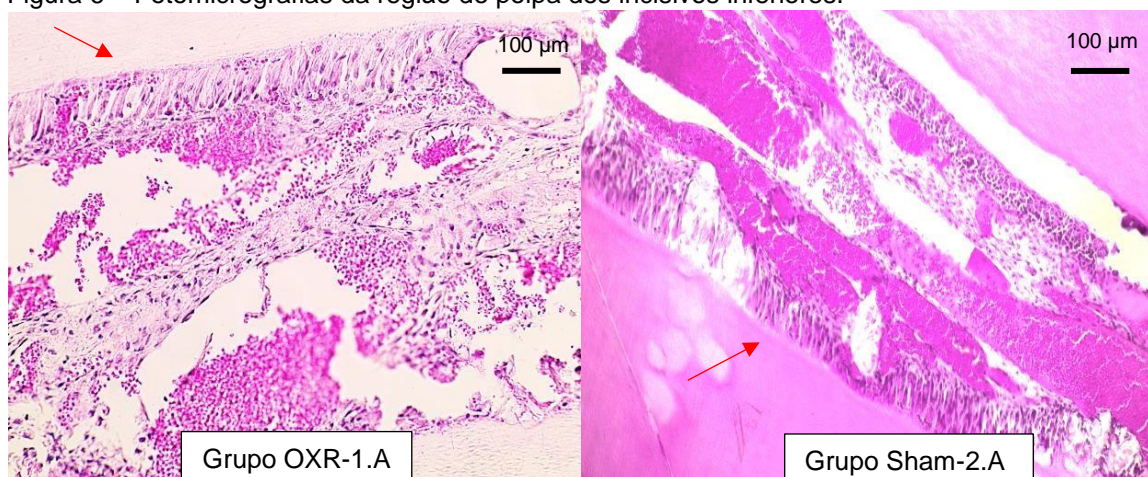
Fonte: Da autora (2022).

Legenda: Estrias longitudinais em toda extensão da dentina (setas pretas). Camada de matriz não mineralizada presente em toda a extensão da dentina, aderida aos odontoblastos diferenciados (setas verdes), denominada pré-dentina (seta azul) indicando frente de mineralização linear. Setas vermelhas indicam préodontoblastos.

Um menor grau de formação de vasos sanguíneos, porém calibrosos. Os odontoblastos deste mesmo grupo estavam dispostos ao longo de toda parte periférica da polpa com arranjo “empalçado”, apresentando diferentes graus de maturação e

comprimento, ação funcional pouco ativa, com forma alongada, núcleo basal e citoplasma com pouco basófilos. Diferentemente dos odontoblastos observados no grupo Sham-2.A, em que os odontoblastos apresentaram células maiores e alongadas, citoplasma bem definido e basófilo e um núcleo menos corado, caracterizando células em estágio de função ativo (FIGURA 6).

Figura 6 – Fotomicrografias da região de polpa dos incisivos inferiores.



Fonte: Da autora (2022)

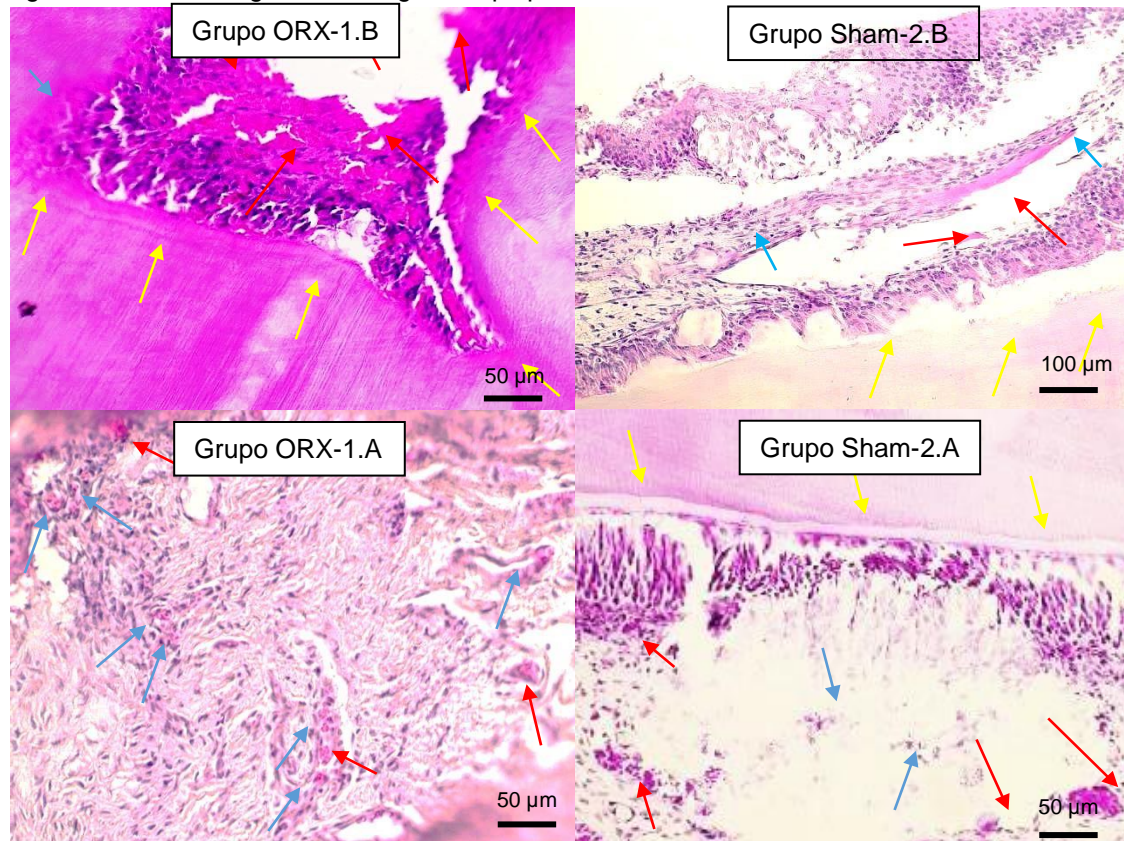
Legenda: Os odontoblastos estão indicados pela seta vermelha.

As polpas dentárias dos incisivos centrais da maxila do grupo ORX-1.B apresentam-se com elevado grau de vascularização, vasos sanguíneos calibrosos caracterizando uma hiperemia pulpar, se comparado ao grupo Sham 2.B. O grupo ORX 1.A apresentou polpas dentárias menos vascularizadas que o grupo e Sham 2.A que apresentou vascularização intensa, presença de estruturas descalcificadas na sua região central e vasos calibrosos e abundantes, grande quantidade de odontoblastos próximos à periferia, formando a pré-dentina com aspecto de normalidade quanto ao arranjo e estrutura (FIGURA 7).

### 5.1.1.3 Osso Alveolar

O osso alveolar do Grupo ORX B na região de incisivo inferior apresentou uma formação óssea imatura, com maior presença de processos precoces de ossificação

Figura 6 – Fotomicrografias da região de polpa dos incisivos inferiores.



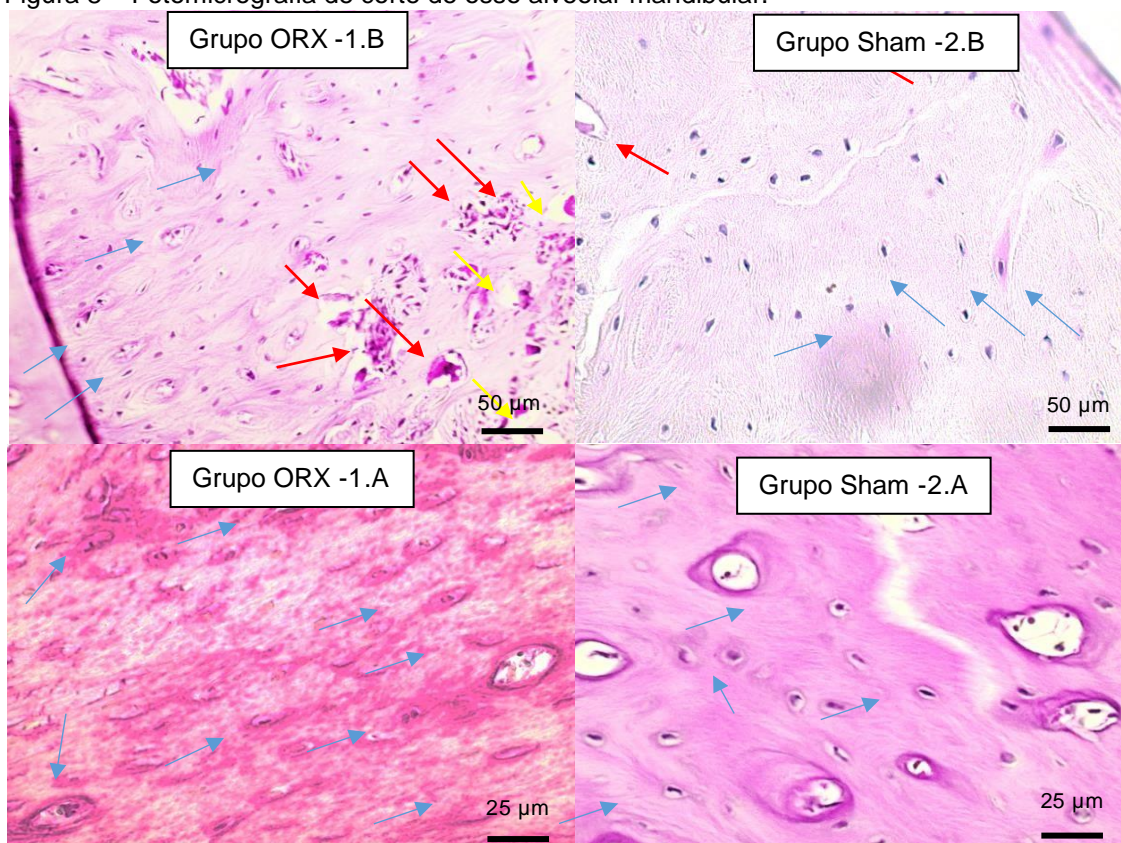
Fonte: Da autora (2022)

Legenda: As setas vermelhas indicam vasos de grande calibre e as setas azuis indicam vasos de menores calibres. As setas amarelas indicam a camada da interface pré- dentina/dentina.

caracterizados por células ósseas jovens, tecido esponjoso, trabéculas grandes, presença de vasos sanguíneos e com tábuas corticais finas significativamente mais evidentes quando comparados aos grupos Sham A e B (FIGURA 8).

Na região de incisivo superior, aparentemente, há um maior número de osteócitos e de trabéculas ósseas na zona de ossificação dos grupos Sham em comparação aos grupos ORX na análise de osso alveolar em torno de todas as raízes. Os grupos ORX apresentam grandes lacunas, evidente processo de angiogênese, neoformação características de osso imaturo com vascularização presente no osso dos grupos ORX maior que o apresentado no Grupo Sham A e B e mais evidente no grupo ORX-1.B. quando comparado ao grupo ORX-1.A (FIGURA 9).

Figura 8 – Fotomicrografia de corte de osso alveolar mandibular.



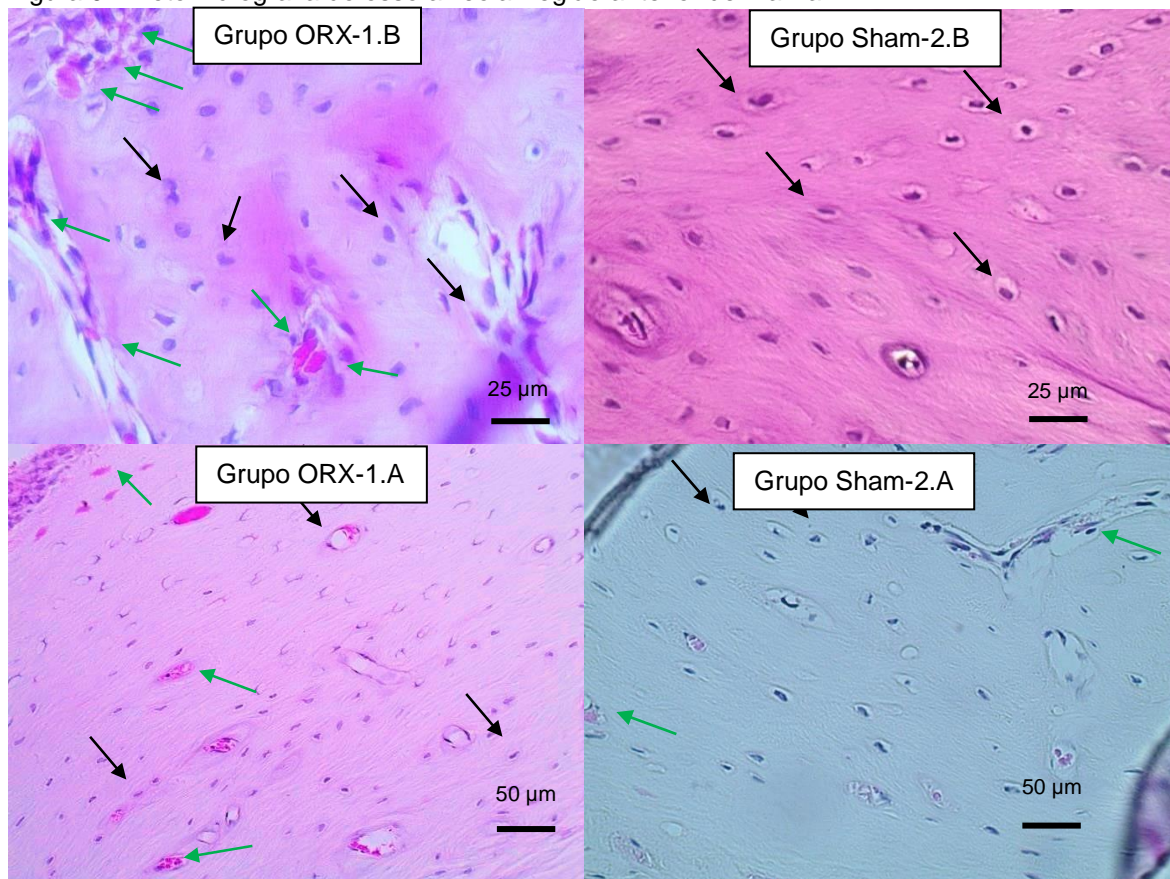
Fonte: Da autora (2022)

Legenda: As áreas globulares (setas vermelhas) em contato com o osso alveolar. O osteócito mostrado pela ponta da seta azul encontra-se paralelo.

#### 5.1.1.4 Ligamento Periodontal

O ligamento periodontal da região dos incisivos inferiores do Grupo ORX 1.A apresenta fibras colágenas oblíquas, com espessuras normais, considerando dentes em função mastigatória, além de presença de macrófagos e cementoblastos incluídos em um material amorfo, mas em menor quantidade quando comparados aos espécimes do Grupo ORX 1.B. A evidência da formação, diferenciação e função do ligamento periodontal fica mais evidente quando comparados os grupos ORX e Sham, já que no grupo Sham os arranjos, o número de cementoblastos e a diferenciação fica mais evidente e condiz com os aspectos de normalidade descritos na literatura considerando a idade dos animais (FIGURA 10).

Figura 9 – Fotomicrografia do osso alveolar região anterior de maxila.

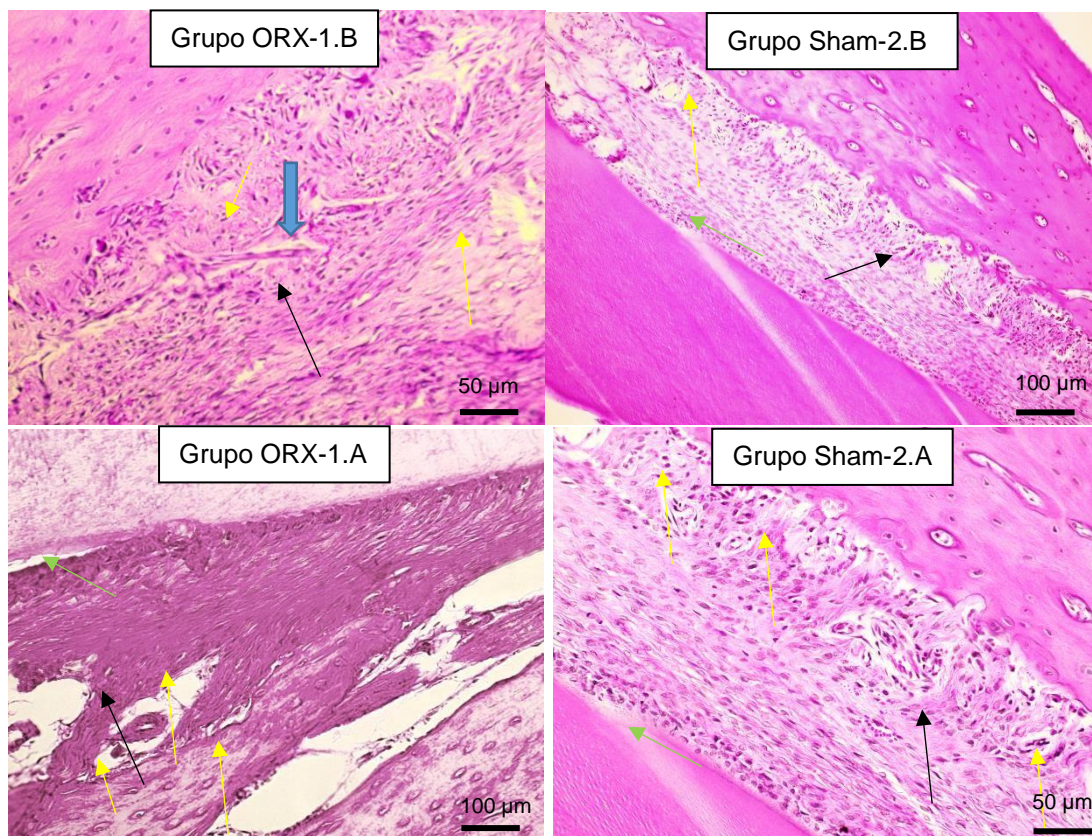


Fonte: Da autora (2022)

Legenda: Observa-se canais vascularizados e inervados (seta verdes). O osteócito mostrado pela a seta preta encontra-se paralelo.

Na região do incisivo superior, as fibras do ligamento apresentavam-se em número e com densidade reduzidos no grupo ORX quando comparados ao grupo Sham. O osso alveolar mostrava trabéculas ósseas arranjadas horizontalmente, com espaços medulares aumentados e formação de novas trabéculas imaturas mais evidentemente no grupo ORX 1.A comparado ao grupo Sham 1.B e 2.B. Linha 37ementaria contínua e sem presença de infiltrado inflamatório foi observada no grupo Sham 2.A quando comparado ao grupo ORX 1.A., que apresenta também as fibras colágenas em normalidade de posição e inserção. O grupo Sham 2.B apresentou uma vascularização mais intensa na região de ápice, quando comparado ao grupo ORX 1.B (FIGURA 11).

Figura 10 – Fotomicrografia de corte da região do ligamento periodontal de incisivo inferiores.



Fonte: Da autora (2022).

Legenda: Observam-se a dentina (seta branca), o espaço que seria ocupado pelo esmalte e pelo cimento (seta verde). O ligamento inferior e as áreas globulares (setas pretas) são bem vascularizadas e innervadas. Observa-se ainda uma veia de médio calibre (seta larga). As fibras de Sharpey, na comunicação do ligamento com o osso, são indicadas pela seta amarela.

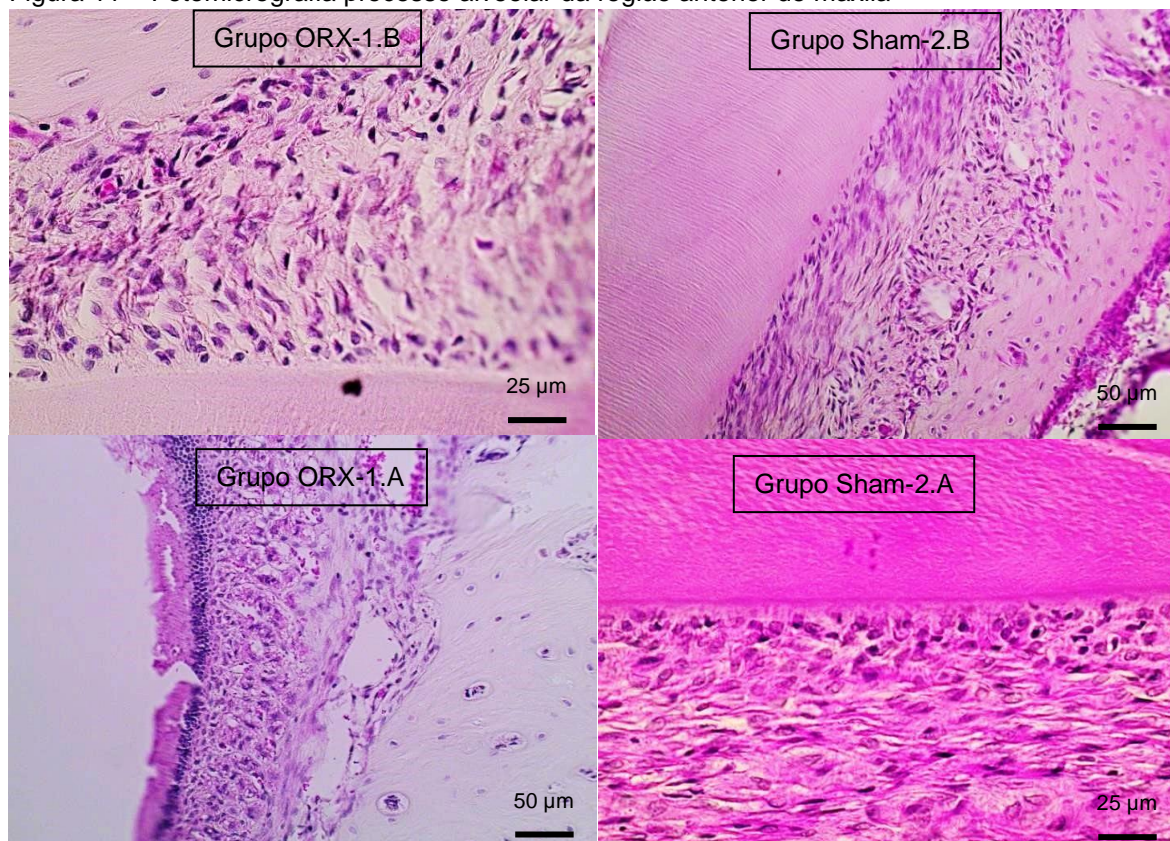
#### 5.1.1.5 Cimento

Os cimentos celular e acelular não foram observados nos Grupos ORX e nos Grupos Sham pois descalcificam durante o processamento.

#### 5.1.2 Cortes Corados com Pricrosírius

Na análise de quantificação de colágeno no ligamento periodontal, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ORX e Sham em nenhum dos tempos experimentais (TABELA 1) (FIGURA 12).

Figura 11 – Fotomicrografia processo alveolar da região anterior de maxila



Fonte: Da autora (2022)

Legenda: As fibras do ligamento apresentavam-se em número e com densidade reduzidos no grupo ORX quando comparados ao grupo Sham.

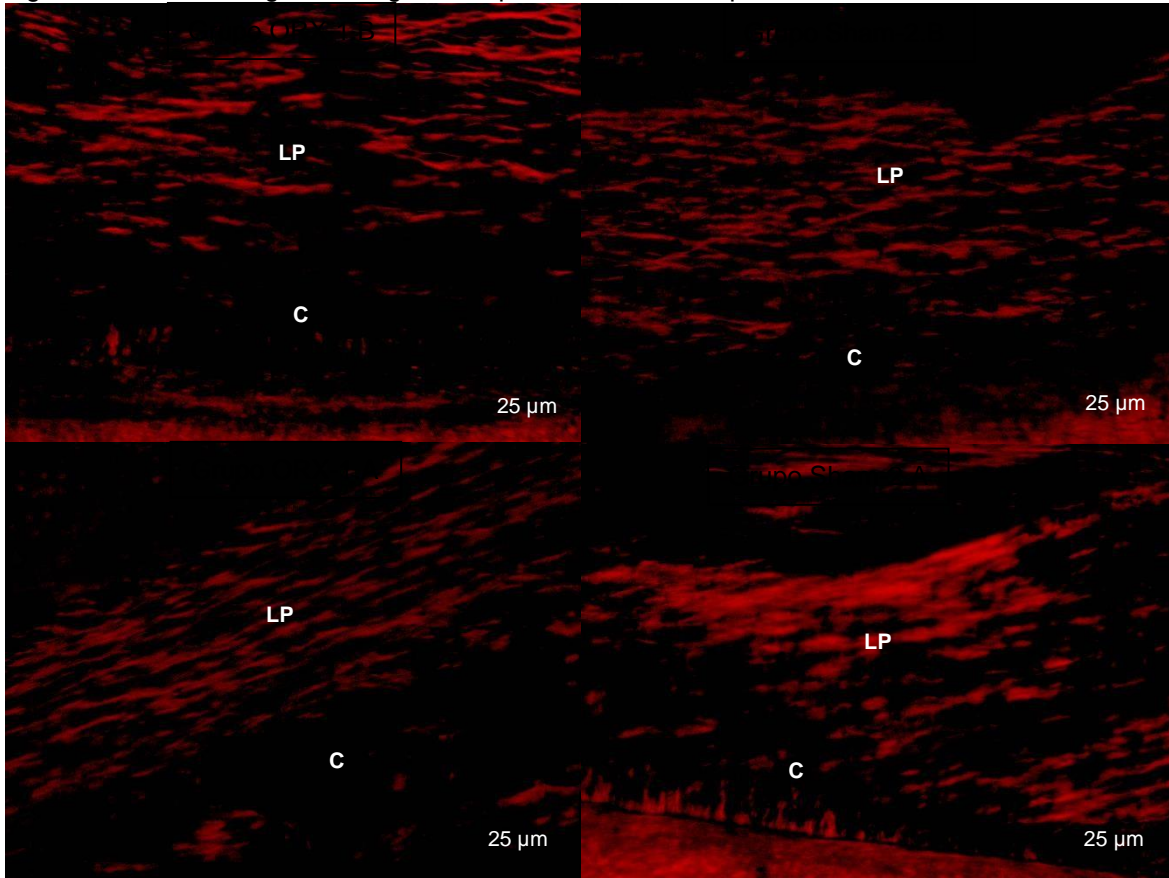
Tabela 1 – Comparação das médias de colágeno entre os grupos.

	Grupos 45 dias (DP)		p	Grupos 73 dias (DP)		p
	<i>Sham</i> (2.B)	ORX (1.B)		<i>Sham</i> (2.A)	ORX (1.A)	
Área de colágeno (Log10)	1,324 (0,10)	1,269 (0,31)	0,696	1,427 (0,14)	1,338 (0,22)	0,349

Fonte: Da Autora (2022)

Nota: DP: Desvio Padrão. Teste t-student foi realizado. Valores em negrito indicam significância estatística.

Figura 12 – Fotomicrografia do ligamento periodontal sob luz polarizada.



Fonte: Da autora (2022)

Legenda: LP: Ligamento Periodontal. C: Cimento

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a redução da testosterona, após a orquiectomia em ratos Wistar durante a puberdade, impactou alguns mecanismos de desenvolvimento das estruturas dentoalveolares. O modelo de roedores Wistar Hannover foi selecionado pois permite uma maior reprodutibilidade com a fisiologia humana, em razão de mais de 90% de seu genoma ser dividido em regiões correspondentes ao dos humanos (WATERSTON *et al.*, 2002). Desta forma, estes resultados contribuem significativamente com o entendimento dos efeitos da diminuição de testosterona, e instiga pesquisadores a realizarem mais estudos em humanos com esta temática, uma vez que apenas dois avaliaram os efeitos da testosterona sobre o dente e, no melhor do nosso conhecimento, nenhum sobre o ligamento periodontal.

Os resultados deste trabalho permitem confirmar a hipótese inicial de que a supressão de testosterona impacta a diferenciação e metabolismo das células das formadoras das estruturas dentárias. A ausência deste hormônio diminuiu consideravelmente a formação de dentina dos incisivos inferiores, com impacto, mais especificamente na frente de mineralização da dentina. Alguns estudos corroboram com nossos resultados: Wang *et al.* (2016) demonstraram que os caninos de macacos orquiectomizados possuíam uma área menor em comparação à macacos do grupo controle; os estudos com humanos de Gaethofs *et al.* (1999) e Roberts *et al.* (1995) demonstram um impacto direto da testosterona sobre a idade dentária de adolescentes durante a puberdade; quanto à mineralização, Reis *et al.* (2022) demonstrou que na área de crescimento endocondral da mandíbula há um atraso na mineralização do trabeculado ósseo em animais orquiectomizados, processo semelhante à mineralização da dentina. No melhor do nosso conhecimento, nenhum estudo avaliou estrutura dentinária de animais orquiectomizados em cortes histológicos. Nossa hipótese é que a testosterona impacta diretamente o processo de mineralização, e níveis reduzidos deste hormônio diminuem tanto a diferenciação quanto a função de odontoblastos. Este impacto pode afetar o tamanho dentário e diminuir a qualidade da dentina, tornando-a mais susceptível à cárie dentária e aos defeitos de desenvolvimento.

Entretanto, quando os incisivos superiores são avaliados, nota-se que não há diferenças entre o grupo experimental e o controle. De fato, estudos indicam que a

morfogênese de cada tipo de dente é diferentemente regulada por diferentes fatores de crescimento. (CAMILLERI; MCDONALD, 2006; ZHANG *et al.*, 2005, XU *et al.*, 2003). Assim, é razoável hipotetizar que a supressão de testosterona pode afetar um tipo ou um grupo de dentes específicos (MARAÑÓN-VÁSQUEZ *et al.*, 2021; GERBER *et al.*, 2021; CUNHA *et al.*, 2021).

Durante 45 a 73 dias, foi observada uma diminuição na tendência de queda de formação de nova dentina e na diferenciação dos odontoblastos. Nesse período também ocorre a queda nos níveis sorológicos de testosterona, GHR e IGF-1 em ratos saudáveis, que indica do pico hormonal do animal e corrobora na hipótese de que a testosterona teria maior impacto no crescimento do animal durante o período de 40 a 50 dias de vida, que é o período de pico de hormônios (EDEN, 1979; HANDELSMAN *et al.*, 1987; VERDONCK *et al.*, 1998a).

A quantidade e morfologia dos ameloblastos eram semelhantes entre os grupos independente do tempo experimental. Uma vez que ameloblastos são sensíveis à testosterona através dos Receptores de Andrógeno (HOUARI *et al.*, 2016; JEDEON *et al.*, 2016), era esperado que houvesse um impacto no número ou na morfologia dessas células. No entanto, a literatura ainda não evidenciou se a testosterona impacta na diferenciação de células epiteliais em ameloblastos maduros, apesar de já ter demonstrado impacto na diferenciação de odontoblastos e fibroblastos (INABA *et al.*, 2013; RODRIGUEZ *et al.*, 2013). É necessário que mais estudos sejam realizados para identificar possíveis efeitos da testosterona sobre o ameloblastos e, conseqüentemente, esmalte.

Os resultados demonstram que a polpa dentária dos animais orquiectomizados possuem vascularização e vasodilatação mais acentuada se comparado ao grupo controle, caracterizando uma hiperemia pulpar. Esta hiperemia pode ser devido ao impacto da testosterona sobre os níveis de mediadores inflamatórios, que modificam a angiogênese na polpa frente às agressões químicas ou físicas (MOHAMAD *et al.*, 2016). Machado *et al.* (2021) não encontraram nenhuma modificação pulpar quando realizaram a movimentação ortodôntica em animais orquiectomizados comparados aos animais do grupo placebo. Entretanto, a idade diferente dos animais entre os estudos pode explicar esta divergência.

A testosterona exerce influência sobre o desenvolvimento de ratos desde a gestação (WEISZ; WARD, 1980). No entanto, Verdonck *et al.*, (1998a) demonstra que a testosterona teria impacto sobre o crescimento craniofacial apenas entre os períodos

de 40 a 50 dias, e não durante a infância do animal. O período entre 40 a 50 dias corresponde ao pico de testosterona, GH e IGF-1 em animais saudáveis (EDEN, 1979; HANDELSMAN *et al.*, 1987; LEE *et al.*, 1975). Dessa forma, a supressão de testosterona teria impacto apenas no momento de pico destes hormônios, e a orquiectomia antes da puberdade seria o momento mais indicado para avaliar seus efeitos sobre o desenvolvimento das estruturas dento-alveolares, conforme demonstra os resultados encontrados em nosso estudo.

Os achados na região do osso alveolar concordam com Mohamad *et al.* (2016), Reis *et al.* (2022), Shapiro e Shklar (1962), Schour (1934), Shklar *et al.* (1967), Steffens *et al.* (2012; 2015), Gonçalves *et al.* (2018), que demonstraram que há impacto da supressão de testosterona na proliferação de células precursoras no perióstio, que resultam em menor número de osteoblastos, osteócitos e osso imaturo. Entretanto, ao fim da puberdade, a testosterona, aparentemente, deixa de influenciar nessa proliferação, sugerindo, novamente, que o hormônio tem maiores impactos apenas durante o pico puberal. O impacto da testosterona sobre o desenvolvimento dento-alveolar pode ocorrer de forma indireta ao regular a angiogênese. A angiogênese é um processo fisiológico que permite a renovação e remodelação óssea. A testosterona já tem sido utilizada como processo terapêutico em lesões ósseas em ratos e um dos principais efeitos dela é a promoção de angiogênese no local da lesão (COSTA *et al.*, 2019; VAN OIRSCHOT *et al.*, 2020). A angiogênese é necessária para a renovação e estímulo de crescimento intramembranoso, além de ser responsável pela chegada de odontoblastos na zona de formação (BIRLIK *et al.*, 2016).

Na análise qualitativa do ligamento periodontal, o número e a densidade das fibras colágenas eram menores, aparentemente. Entretanto, na análise quantitativa, não foi observada diferenças estatísticas entre os grupos em nenhum tempo experimental. Devido à influência da testosterona sobre os fibroblastos, esperava-se que houvesse um impacto direto na produção de colágeno, assim como demonstrado por Reis *et al.* (2022) e Arai *et al.* (2017). Nossa hipótese é que, neste estudo, foi possível avaliar apenas a porção média da raiz do incisivo inferior, e não o ligamento periodontal como um todo, o que pode ser considerado uma limitação deste estudo. A avaliação da influência da supressão de testosterona nas estruturas dentárias e periodontais torna esse estudo relevante, pois corrobora para o avanço no entendimento da etiologia das deficiências hormonais nas alterações fisiológicas

dentárias e periodontais. Além disso, este estudo também sugere que novas pesquisas em humanos sejam realizadas, de modo a mensurar os níveis sorológicos de testosterona durante a puberdade e correlacionar com a resposta de reparação das estruturas dento-alveolares. Este estudo também destaca a importância da análise sorológica do paciente antes de iniciar o tratamento ortodôntico e periodontal a fim de levantar fatores que podem ser significativos durante o crescimento e durante a movimentação ortodôntica, como, por exemplo, os baixos níveis de testosterona, que podem influenciar diretamente na resposta do hospedeiro frente ao tratamento.

A impossibilidade de realizar análise estatística de todas as observações histológicas é uma limitação deste estudo. No entanto, é possível inferir que as estruturas analisadas são afetadas pela supressão de testosterona apenas nas comparações qualitativas entre os grupos. Outra limitação foi a ausência de medidas sorológicas de testosterona, mas a orquiectomia é um procedimento aprovado na literatura, sendo eficaz para a redução dos níveis de testosterona (IDRIS, 2012).

## 7 CONCLUSÃO

Concluimos com esse estudo que:

- a) a orquiectomia durante a puberdade de ratos Wistar, altera a formação óssea no período de 45 e 73 dias;
- b) não houve alteração na quantificação do colágeno do ligamento periodontal dos incisivos inferiores e esses resultados podem estar relacionados exclusivamente a esse grupo de dentes;
- c) as análises comparativas observacionais, mostraram que a circulação nas polpas dentárias sofreu alterações nos grupos com deficiência de testosterona com 45 e 73 dias, levando a uma menor formação de pré-dentina.

## REFERÊNCIAS

- ARAI, K. Y. *et al.* Postnatal changes and sexual dimorphism in collagen expression in mouse skin. **PloS one**, San Francisco, v. 12, n. 5, p. e0177534, 2017.
- ARNOLD, W. H.; GAENGLER, P. Quantitative analysis of the calcium and phosphorus content of developing and permanent human teeth. **Annals of AnatomyAnatomischer Anzeiger**, New York, v. 189, n. 2, p. 183-190, 2007.
- AVERY J, C.D. **Essentials of oral histology and embryology**. 2nd ed. Saint Louis, MO: Mosby; 2005.
- BAGATELL, C. J.; BREMNER W. J. Androgens in men – uses and abuses. **N Engl J Med.**, Boston, v. 334, n. 11, p.707-714, 1996.
- BHASIN, S. *et al.* Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: an endocrine society clinical practice guideline. **J Clin Endocrinol Metab**, New York, v. 95, n. 6, p. 2536-59, June. 2010.
- BIRLIK, M. *et al.* Effect of sex steroids on bone formation in an orthopedically expanded suture in rats. **Journal of Orofacial Orthopedics/Fortschritte der Kieferorthopädie**, München, v. 77, n. 2, p. 94-103, 2016.
- BROWN, R. E. Social and hormonal factors influencing infanticide and its suppression in adult male long-evans rats (*rattus norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology**, London, v. 100, n. 2, p. 155-61, 1986.
- BUSATO, M.C.A. *et al.* Microscopic evaluation of induced tooth movement after subluxation trauma: an experimental study in rats. **Dental Press J Orthod**, Maringa, v.19, n.1, p. 92-9, 2014.
- CAMILLERI, S.; MCDONALD, F. Runx2 and dental development. **European Journal of Oral Sciences**, Amsterdam, v. 114, n. 5, p. 361-373, 2006.
- CENTRAL MICHIGAN UNIVERSITY. **Guidelines for Rodent Survival Surgery**. Ann Arbor, 2013.

CHO, M.I.; GARANT, P.R. Development and general structure of the periodontium. **Periodontol 2000**, London, v. 24, n. 1, p. 9-27, 2000.

CHOUDHURY, B.K. *et al.* Gonadal function in young adult males with metabolic syndrome. **Diabetes Metab Syndr.**, Los Angeles, v. 7, n. 3, p.129-132, 2013.

COSTA, L.A; CANTANHEDE, L.M; PEREIRA, E.M. Validation of a new experimental model of extrusive luxation on maxillary molars of rats: a histological study. **Clin Oral Investig**, Berlin, v. 22, n. 5, p.1985- 1994, 2017.

COSTANZO, L.S. **Physiology**. 3rd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006.

CUNHA, Arthur S. *et al.* Genetic variants in tooth agenesis–related genes might be also involved in tooth size variations. **Clinical Oral Investigations**, Berlin, v. 25, n. 3, p. 13071318, 2021.

DALTABAN, O.; SAYGU N, I.; BOLU.E. Periodontal status in men with hypergonadotropic hypogonadism: effects of testosterone deficiency. **J Periodontol.**, London, v.77, n. 7, p. 179-183, 2006.

DANDONA, P.; ROSENBERG, M.T. A practical guide to male hypogonadism in the primary care setting. **Int J Clin Pract.**, Oxford, v.64, n. 6, p.682-696, 2010.

DI BENEDETTO, A. *et al.* Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. **Clin Dev Immunol.**, Egypt, 2013. doi: 10.1155/2013/503754

EDÉN, S. Age- and sex-related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. **Endocrinology** , Champaign, v. 105, n. 2, p. 555-60, 1979.

ELMEGUIDA, A.B.D ;YU, D.C. Dental pulp neurophysiology: Part 1. Clinical and diagnostic implications. **Jornal of the Canadian Dental Association** , Ottawa, v.75, n. 1, p.5559, Feb. 2009.

ESTRELA, C. **Ciência endodôntica**. São Paulo: Artes Médicas, 2007.

FERRARIS, M.E.G.; MUNHOZ, A.C. **Histologia e embriologia bucodental**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

FITZGERALD, M.; CHIEGO JR, D. J.; HEYS, D. R. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 35, n. 9, p. 707-715, 1990.

FOSTER, B.L. *et al.* Deficiency in acellular cementum and periodontal attachment in bsp null mice. **J Dent Rest.**, Tehran, v.92, n. 2, 166- 172, 2013.

FOSTER, B.L. Methods for studying tooth root cementum by light microscopy. **Int j Oral Sci.**, Milpitas, v 4, n. 3, p.119-128, 2012.

GERBER, Jennifer Tsi *et al.* Odontogenesis-related candidate genes involved in variations of permanent teeth size. **Clinical Oral Investigations**, Berlin, v. 25, n. 7, p. 44814494, 2021.

GIBBS, R. A. *et al.* Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. **Nature**, London, v. 428, p. 493-522, 2004.

GONÇALVES, V.P. *et al.* Long-term testosterone depletion attenuates inflammatory bone resorption in the ligature-induced periodontal disease model. **Journal of Periodontology**, Copenhagen , v. 89, n. 4, p. 466-475, 2018.

GOOREN, L.J. Androgens and male aging: Current evidence of safety and efficacy. **Asian J Androl.**, Shanghai, v.12, n. 2 , p.136-151, 2010.

HANDELSMAN, D. J. *et al.* Hormonal regulation of the peripubertal surge of insulinlike growth factor-i in the rat. **Endocrinology**, Oxford, v. 120, n. 2, p. 49197, 1987

HARING, R. *et al.* Prevalence, incidence and risk factors of testosterone deficiency in a population-based cohort of men: results from the study of health in Pomerania. **Aging Male**. St. Louis, v.13, n. 4, p. 247-257, 2010.

HARING, R. *et al.* Prospective inverse associations of sex hormone concentrations in men with biomarkers of inflammation and oxidative stress. **J Androl.**, Oxford, v.33, n. 5, p. 944950, 2012.

HOOIJMANS, C. R.; LEENAARS, M.; RITSKES-HOITINGA, M. A Gold Standard Publication checklist to improve the quality of animal studies, to fully integrate the three rs, and to make systematic reviews more feasible. **Atla**, London, v. 38, p. 16782, 2010.

HOUARI, S. *et al.* Expression of steroid receptors in ameloblasts during amelogenesis in rat incisors. **Frontiers in Physiology**, Bethesda, v. 7, p. 503, 2016.

IDRIS, A. I. Ovariectomy/orchidectomy in rodents. **Methods Mol Biol**, London, v. 816, p. 54551, 2012.

INABA, T. *et al.* Expression status of mRNA for sex hormone receptors in human dental pulp cells and the response to sex hormones in the cells. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 58, n. 8, p. 943-950, 2013.

INGLESIAS- LINARES, A. *et al.* Orthodontically induced external apical root resorption in patients treated with fixed appliances vs removable aligners. **Angle Orthod**, Appleton, v. 87, n. 1, p. 3-10, 2016.

JEDEON, K. *et al.* Androgen receptor involvement in rat amelogenesis: an additional way for endocrine-disrupting chemicals to affect enamel synthesis. **Endocrinology**, Oxford, v. 157, n. 11, p. 4287-4296, 2016.

JING, Z. *et al.* Factors affecting the clinical success rate of miniscrew implants for orthodontic treatment. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v. 31, n. 4, p. 835-41, July/Aug. 2016.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e embriologia oral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

KAUFMAN, J.M.; VERMEULEN, A. The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. **Endocr Rev.**, New York, v. 26, n. 6, p. 833-876, 2005.

- KIKUTA, J. *et al.* Notch signaling induces root resorption via RANKL and IL-6 from hPDL cells. **J Dent Res**, Amsterdam, v. 1, n. 94, p. 1407, 2015.
- KILKENNY, C. *et al.* Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 160, n. 7, p. 1577-1579, 2010.
- KOOLHAAS, J. M. The laboratory rat. *In*: HUBRECHT, R.; KIRKWOOD, J. **The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2010. cap. 22, p. 311-326.
- LEE, V. W. K. *et al.* Variations in serum fsh, lh and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. **J. Reprod. Fert.**, Woolley, v. 42, p. 121-126, 1975.
- LEROUXEL, E. *et al.* Mandibular bone loss in an animal model of male osteoporosis (orchidectomized rat): a radiographic and densitometric study. **Osteoporos Int**, London, v. 15, n. 10, p. 814-9, Oct. 2004.
- MACHADO, M.A *et al.* Histological analysis of the pulp tissue of rats with testosterone deficiency submitted to orthodontic tooth movement induced. **Brazilian Journal of Development**, São Paulo, v. 7, n. 7, p. 65928-65943, 2021.
- MALLIKARJUNAPPA, A.S. *et al.* Collagen—The skeleton of the periodontium: a review. **Journal of Scientific Dentistry**, Dehradun, v. 11, n. 1, p. 32, 2021.
- MARAÑÓN-VÁSQUEZ, G.A. *et al.* FGF10 and FGF13 genetic variation and tooth-size discrepancies. **The Angle Orthodontist**, St. Louis, v. 91, n. 3, p. 356-362, 2021.
- MARIOTTI, A.; MAWHINNEY, M. Endocrinology of sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. **Crit Rev Oral Biol Med.**, v. 5, n. 1, p. 27-53, 1994.
- MARQUEZ HERNANDEZ, R. A. *et al.* Sex hormones receptors play a crucial role in the control of femoral and mandibular growth in newborn mice. **Eur J Orthod**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 564-9, Oct. 2011.
- MIOT, H. A. Sample size in clinical and experimental trials. **J Vasc Bras**, Salvador, v. 10, n. 4, p. 275-8, 2011.

MOHAMAD, N. V.; SOELAIMAN, I. N.; CHIN, K. Y. A concise review of testosterone and bone health. **Clin Interv Aging**, New Zealand, v. 11, p. 1317-1324, 2016.

MOORADIAN, A.D.; MORLEY, J.E.; KORENMAN, S.G. Biological actions of androgens. **Endocr Rev.**, New York, v.8, n. 1, p. 1-28, 1987.

NANCI, A.; BOSSHARDT, D.D. Structure of periodontal tissues in health and disease. **Periodontol 2000**, London, v. 40, n. 1, p.11-28, 2006.

OMORI, M. A. *et al.* Effect of ovariectomy on maxilla and mandible dimensions of female rats. **Orthod Craniofac Res**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 342-350, Aug. 2020.

OTTO, Glen M.; FRANKLIN, Craig L.; CLIFFORD, Charles B. Biology and diseases of rats. *In*: FOX, J. G. *et al.* **Laboratory animal medicine**. Oxford: Academic Press, 2015. cap. 4, p. 151-207.

PERRY, B. C. *et al.* Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp–derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. **Tissue Engineering: Part C**, Palm Bay, v.14, n.2, p. 146-156, 2008.

PRITCHETT-CORNING, K. R. *et al.* Principles of rodent surgery for the new surgeon. **Journal of Visualized Experiments**, Boston, n. 47, 2011.

REIS, C.L.B. *et al.* Testosterone suppression impacts craniofacial growth structures during puberty. **J Orofac Orthop**, München, Feb. 2022. doi.org/10.1007/s00056-021-00373-4

REIS, C.L. B. *et al.* Does suppression levels of testosterone have an impact in the craniofacial growth? a systematic review in animal studies. **Brazilian Journal of Development**, São Paulo, v. 7, n. 7, p. 75630-75648, 2021.

ROBERTS, M. W. *et al.* Dental development in precocious puberty. **Journal of Dental Research**, Thousand Oaks, v. 64, n. 8, p. 1084-1086, 1985.

RODRÍGUEZ, H. *et al.* Stem cells and androgen receptor in human periapical periodontitis. **Int. J. Morphol**, Temuco, v. 29, n. 3, p. 947-953, 2011.

ROTHBARTH, C.P. *et al.* Effects of the bisphosphonate alendronate on molars of young rats after lateral luxation. **Dent Traumatol**, Copenhagen, n.30, p. 415-22, 2014.

SALONIA, A. *et al.* Paediatric and adult-onset male hypogonadism. **Nature Reviews Disease Primers**, London, v. 5, n. 1, p. 1-21, 2019

SCHIPF, S. *et al.* Low total testosterone is associated with increased risk of incident type 2 diabetes mellitus in men: results from the Study of Health in Pomerania (SHIP). **Aging Male**. Philadelphia, v.14, n. 3, p.168-175, 2011.

SCHOUR, I. The effect of hypophysectomy on the periodontal tissues. **The Journal of Periodontology**, Seoul, v. 5, n. 1, p. 15-24, 1934.

SEIFI, Massoud *et al.* The effect of ovariectomy and orchietomy on orthodontic tooth movement and root resorption in Wistar rats. **Journal of Dentistry**, Seoul, v. 16, n. 4, p. 302, 2015.

SHAPIRO, S.; SHKLAR, G. The effect of hypophysectomy on the periodontium of the albino rat. **The Journal of Periodontology**, Seoul, v. 33, n. 4, p. 364-371 1962.

SHKLAR, G; CHAUNCEY, H.H.; SHAPIRO, S. The effect of testosterone on the periodontium of normal and hypophysectomized rats. **The Journal of Periodontology**, Seoul, v. 38, n. 3, p. 203-210, 1967.

SMITH, A. J. *et al.* Reactionary dentinogenesis. **International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, v. 39, p. 273-280, 1995.

SMITH, A. J. *et al.* Prepare: guidelines for planning animal research and testing. **Lab Anim**, , New York, v. 52, n. 2, p. 135-141, Apr. 2018.

STEFFENS, J.P. *et al.* Androgen receptors and experimental bone loss—An in vivo and in vitro study. **Bone**, New York, v. 81, p. 683-690, 2015.

STEFFENS, J.P. *et al.* The effect of supra-and subphysiologic testosterone levels on ligature-induced bone loss in rats—A radiographic and histologic pilot study. **Journal of Periodontology**, Seoul, v. 83, n. 11, p. 1432-1439, 2012.

SVARTBERG, J. *et al.* Association of endogenous testosterone with blood pressure and left ventricular mass in men. **Eur J Endocrinol.**, Oslo, v.150, n. 1, p. 65-71, 2004.

TEN CATE, A.R. **Histologia bucal desenvolvimento, estrutura e função.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

TONDELLI, P.M. *et al.* Knowledge on dental trauma and orthodontic tooth movement held by a group of orthodontists. **Braz Oral Res**, São Paulo, v.24, n. 1, p.76–82, 2010.

TORKLER, S. *et al.* Inverse association between total testosterone concentrations, incident hypertension and blood pressure. **Aging Male**, Philadelphia, v.14, n. 3, p. 176-182, 2011.

VAN OIRSCHOT, B. A. J. A. *et al.* Evaluation of collagen membranes coated with testosterone and alendronate to improve guided bone regeneration in mandibular bone defects in minipigs. **Journal of Oral & Maxillofacial Research**, Kaunas, v. 11, n. 3, 2020.

VANDERSCHUEREN, D. *et al.* Sex steroid actions in male bone. **Endocr Rev**, New York, v. 35, n. 6, p. 906-60, Dec. 2014.

VERDONCK, A. *et al.* Comparative effects of neonatal and prepubertal castration on craniofacial growth in rats. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 43, p. 861-71, 1998b.

VERDONCK, A. *et al.* Effect of low-dose testosterone treatment on craniofacial growth in boys with delayed puberty. **European Journal of Orthodontics**, Oxford, v. 21, p. 137-43, 1999.

VERDONCK, A. *et al.* Effect of testosterone replacement after neonatal castration on craniofacial growth in rats. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 43, p. 551-557, 1998a.

WANG, Q. *et al.* The mandibles of castrated male rhesus macaques (*Macaca mulatta*): the effects of orchidectomy on bone and teeth. **American Journal of Physical Anthropology**, Hoboken, v. 159, n. 1, p. 31-51, 2016.

- WATERSTON R.H., *et al.* Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. **Nature**, London, v. 420, p. 520–562, 2002.
- WEISZ, J.; WARD, I. L. Plasma Testosterone and Progesterone Titers of Pregnant Rats, Their Male and Female Fetuses, and Neonatal Offspring. **Endocrinology**, Oxford, v. 106, n. 1, p. 306-17, 1980.
- WESPES, E.; SCHULMAN, C.C. Male andropause: myth, reality, and treatment. **Int J Impot Res.**, London, v.14, n. 1, p.b93-98, 2002.
- WU, J. *et al.* androgen receptor sumoylation regulates bone mass in male mice. **Mol Cell Endocrinol**, Amsterdam, v. 479, p. 117-122, 2019b.
- XIAO, L.; NASU, M. From regenerative dentistry to regenerative medicine: progress, challenges, and potential applications of oral stem cells. **Stem Cells Cloning.**, New York, v.4, n. 7, p.89-99, 2014.
- XU, X. *et al.* Developmental expression of Smad1-7 suggests critical function of TGFbeta/BMP signaling in regulating epithelial-mesenchymal interaction during tooth morphogenesis. **International Journal of Developmental Biology**, Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 3139, 2003.
- YU, Christine; ABBOTT, Paul V. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. **Australian Dental Journal**, Darlinghurst, v. 52, p. S4-S6, 2007.
- ZHANG, Yan Ding *et al.* Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. **Cell Research**, Hoboken, v. 15, n. 5, p. 301-316, 2005.
- ZIRKIN, B.R.; TENOVER, J.L. Aging and Declining Testosterone: past, present, and hopes for the future. **J Androl.**, Shanghai, v.33 , n. 6, p.1111-1118, 2012.

## ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG  
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000  
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Influência da testosterona no crescimento e desenvolvimento facial", registrada com o nº 24/2019, sob a responsabilidade de Daniela Silva Barroso de Oliveira, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 05/07/2019 a 06/08/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	36
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 05 de Julho de 2019.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida  
 Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG