



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Vinícius de Paiva Gonçalves

Impacto de andrógenos sobre o processo de reparação tecidual e o mecanismo de reabsorção óssea

Araraquara

2018



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Vinícius de Paiva Gonçalves

Impacto de andrógenos sobre o processo de reparação tecidual e o mecanismo de reabsorção óssea

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara, para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio

Araraquara

2018

Gonçalves, Vinícius de Paiva

Impacto de andrógenos sobre o processo de reparação
tecidual e o mecanismo de reabsorção óssea / Vinicius de Paiva
Gonçalves. – Araraquara: [s.n.], 2018

174 f. ; 30 cm

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio

1. Tecido de granulação 2. Reabsorção óssea
3. Periodontite 4. Inflamação 5. Androgênios 6. Ratos
I. Título

Vinícius de Paiva Gonçalves

Impacto de andrógenos sobre o processo de reparação tecidual e o mecanismo de reabsorção óssea

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Odontologia – Área de Periodontia

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio

2º examinadora: Profa. Dra. Flávia Adelino Suaid Malheiros

3º examinadora: Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira

4º examinadora: Profa. Dra. Estela Sasso Cerri

5º examinadora: Profa. Dra. Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

Araraquara, 27 de março de 2018.

DADOS CURRICULARES

Vinícius de Paiva Gonçalves

NASCIMENTO: 06.10.1989 – Uberaba / MG

FILIAÇÃO: José Augusto Gonçalves da Silva

Ionice Paiva da Silva Gonçalves

2007 – 2010: Curso de Graduação em Odontologia

Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos – UNIFEB

2012 – 2014: Curso de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Periodontia

Nível: Mestrado

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2013 – 2014: Curso de Especialização em Periodontia

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2014 – 2018: Curso de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Periodontia

Nível: Doutorado

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedico esse trabalho os meus amados pais, *José Augusto Gonçalves da Silva e Ionice Paiva da Silva Gonçalves*, que como maior incentivo durante esta minha jornada, caminharam arduamente ao meu lado.

Foram incansáveis! E jamais mediram esforços ou questionaram-se sobre qualquer sacrifício por mim realizado. Pelo contrário, são incontáveis os momentos em que abdicaram de suas necessidades em realização às minhas.

À vocês, que sempre incitaram-me o desejo de evoluir e buscar ser a cada dia um ser humano melhor. Não melhor que o próximo, mas ao que era ontem! Tornando-me apto a oferecer o que de melhor possuir, às minhas ações.

À vocês, que são meus melhores mestres. Que um dia me mostraram um caminho, o do bem! E através de seus exemplos, por ele me ensinaram a caminhar e um verdadeiro ser humano me tornar.

Obrigado Pai, por todas as vezes em que disse: “Deus jamais desampara alguém, principalmente o homem bom!”. Obrigado Mãe, pelos inúmeros momentos em que não cansou de repetir: “Com paciência e humildade, a gente chega lá!”. Todo esse amor, carinho e incentivo, foram imprescindíveis não apenas na trajetória do Doutorado, mas durante a vida toda; e sempre apegado a esses melhores sentimentos, os quais me ensinaram, fui caminhando e batalhando em busca de minhas metas. E hoje, por meio deste, concluo mais uma etapa. E os agradecimentos são meus! À vocês, meus queridos pais, agradeço a compreensão em todas as minhas escolhas, e incentivo à conquista delas. Sempre perseveramos juntos! Portanto, recebam este trabalho como retribuição por toda dedicação e amor que sempre a mim dispensaram. Essa conquista é nossa! Vocês são seres humanos incríveis e iluminados, que contribuem dia-a-dia em minha evolução! **AMO MUITO VOCÊS!!**

“Uma das coisas mais importantes na educação de um filho, é levá-lo a admirar seu educador.” (Augusto Cury)

AGRADECIMENTOS

À *Deus*, por prover a vida e nela ser tão generoso, proporcionando diversas oportunidades de evolução, e durante esta trajetória jamais me ver sem seu amparo.

Aos meus queridos avós, *Francisco Nunes da Silva (in memoriam)*, *Jerônima Madalena de Paiva, José Nilton Geraldo (in memoriam)* e *Maria Lúcia Gonçalves da Silva (in memoriam)*, que independente do convívio conseguiram transmitir todo seu amor e carinho, e sempre com extrema simplicidade e humildade me fizeram aprender os verdadeiros valores do ser humano. Vocês caminham comigo diariamente, principalmente através de seus grandiosos ensinamentos! Amo muito vocês!

À *Lauriê Garcia Belizário*, namorada, amiga e companheira... São incontáveis os motivos a agradecê-la! Mas o maior deles, e o que sustenta os demais, é o grandioso amor que cultiva por mim, demonstrado dia-a-dia, nos mais minuciosos atos. Seu amor me ampara, me guia e fortalece a todo momento. A caminhada com você é mais segura, seu companheirismo contribui constantemente com minha evolução, e seu cuidado reforça a cada dia o desejo de continuar a trajetória por todo o sempre com você! Ao lado de todo grande homem, sempre há uma grande mulher... Obrigado por sê-la! Essa é a forma mais simplificada que encontrei para dizer como é grande e inesgotável o meu amor por você, e o quanto sou grato à Deus por tê-la em minha vida! Gratidão pelos momentos de auxílio durante o Doutorado, e a caminhada em Araraquara! A você também dedico, com imenso carinho, este trabalho! **AMO VOCÊ!**

À minha família materna e paterna... *Paiva e Gonçalves*, que compreende inúmeras pessoas e todas muito queridas e amadas. Meus queridos tios, padrinhos, primos e afilhados, que sempre estiveram na torcida, transmitindo excelentes vibrações, e muitas vezes participando diretamente desta minha caminhada. A união e amor de vocês são imprescindíveis! Amo muito vocês!

À família *Garcia Belizário*, uma segunda família que Deus foi tão generoso em me presentear... À minha sogra, *Laura Belizário* que como uma mãe sempre me acolheu, e sempre demonstrou tanto carinho e zelo... Aos meus cunhados e amigos *Lícia Clara, Lucilara, Sérgio Francisco, Mirela e Giovanni*, e aos sobrinhos de coração *Ana Clara, Maria Paula e Samuel*, agradeço imensamente o carinho e acolhimento de vocês! E ao meu sogro *Sérgio Savik (in memoriam)*, que compartilho diariamente de seus ensinamentos e integridade através de sua amada filha! A todos, meu muito obrigado! Adoro demais vocês!

Ao querido orientador, *Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio*, pelas oportunidades de aprendizado e crescimento, e por toda a confiança e credibilidade na realização deste trabalho, o qual não seria possível sem sua orientação. Agradeço de coração, por acreditar em minhas capacidades! Gratidão pelo convívio diário, alegre, saudável e de tantos momentos de risadas! Esses momentos, os ensinamentos, e nossa amizade, estarão sempre comigo!

À **Walkyria Lacerda Oliveira** (Wal), minha amiga de sempre e para sempre; irmã de alma e coração. Em você sempre encontro a solução de tantas coisas, e o ombro verdadeiramente amigo. Mesmo distante, sua presença fraterna sempre se faz presente. Nossa sintonia transcende qualquer barreira física e laços consanguíneos! Amo muito você minha amiga!

Ao amigo e irmão **Tiago Silva da Fonseca**. Nossa história em Araraquara foi muito bonita! Incontáveis são os momentos de felicidade que compartilhamos. Não podemos falar em dificuldades, em circunstâncias menos alegres, pois nossa amizade grandiosa sempre nos manteve fortes! Juntos perseveramos, sorrimos e algumas vezes choramos, mas em nossa fraternidade sempre nos amparamos, auxiliamos e construímos uma trajetória que tenho muita felicidade e orgulho em recordar. Hoje fica a saudade dos dias de luta, mas continuaremos juntos nos dias de glória, e na batalha constante da vida conte comigo sempre! Tentei ser resistente, porém não consegui... Vou ter que “dar o braço a torcer” e dizer que amo você meu amigo! Estarei sempre emanando boas energias a você, e torcendo pela sua prosperidade e felicidade, pessoal e profissional! Aos seus queridos pais **Josè Anísio** e **Ana**, minha gratidão e carinho pela enorme consideração e acolhimento!

À **Adriana Cabrera Ortega** (Adrianita)... Nesses seis anos de convivência construímos uma relação indescritível, nos tornamos melhores amigos, e sempre caminhando lado a lado cumprimos nossa tarefa da melhor forma possível! Sempre com muita alegria, auxiliamos um ao outro na luta diária, independente dos caminhos que seguimos. São muitas coisas a agradecê-la, e muito tenho a agradecer a Deus pela sua amizade. Obrigado pela nossa convivência fraterna! Adoro você! Estarei sempre na torcida por sua felicidade, sucesso e prosperidade!

À querida amiga **Patrícia Maquera (Patty)**, agradeço por tantos momentos de alegria e risadas! Você é uma amiga muito especial! Obrigado também pela imprescindível colaboração na realização deste trabalho!

À querida **Ana Laura Bizeli**... Agradeço de coração por todo imprescindível auxílio nas jornadas de trabalho! Obrigado pelos ensinamentos frequentes, e a amizade! Estarei sempre torcendo pelo seu melhor, e conte comigo para o que precisar!

Aos amigos de Conceição das Alagoas, os quais não citarei por receio de esquecer alguém. Agradeço pela amizade e carinho, sempre acompanhando minha caminhada. Adoro vocês!

Aos queridos professores de Lassance, Conceição das Alagoas e Barretos, por todo incentivo e carinho de sempre para com minha pessoa. São incomparáveis!

Às queridas amigas **Paula Macedo (Paulinha)** e **Luana Sabino**... Agradeço imensamente a amizade que muita felicidade me proporcionou nessa trajetória em Araraquara! São inúmeros os momentos bons

e lembranças que cultivo com carinho! Vocês são pessoas muito especiais, que levarei para sempre comigo! Adoro vocês demais da conta!

Às queridas amigas **Miriam Magro** (Miris) e **Ana Carolina Venção** (Carol). Nesses anos compartilhamos momentos alegres e divertidos, e outros nem tanto assim; consolamos um ao outro nos momentos saudosos de casa, e em diversas situações nos vimos como irmãos. Agradeço imensamente pela amizade, e pela solidariedade em vários momentos que necessitei. Adoro vocês!

Aos amigos... **Cássio Rocha, Elton Pichotano, Fernanda Florian, Fernando Magalhães, Jackeline Tsurumaki, Livia Moretti, Mateus Delfino, Rafael Nepomuceno, Sâmara Tfaile, Suzane Pigossi**. Agradeço a amizade, os momentos de diversão e colaboração em vários momentos que necessitei. Adoro vocês!

Aos amigos **Mariana Mena Barreto** e **Gabriel Pivoto**... Amigos de tão pouco tempo, mas que tenho enorme afinidade e apreço! Agradeço por todos os momentos de alegria e auxílio! Amigos “manos manauaras”, contem sempre comigo! Adoro muito vocês!

Aos amigos **Laura Gonzalez** e **Meialagan Velayutham**... Companheiros nas jornadas de biotério e laboratório, agradeço por toda a cooperação nos árduos momentos de trabalho!

A todos os demais amigos da Pós-graduação, por toda a colaboração em muitas circunstâncias que de ajuda necessitei, e sempre atenderam prontamente. Obrigado pela amizade também!

À querida **Gabriela Teixeira**... Que em poucos meses de convívio despertou enorme estima, e ao decorrer do tempo solidifica ainda mais sua amizade!

À querida Profa. **Denise Madalena Palomari Spolidorio**, agradeço pela imprescindível colaboração na realização deste trabalho, os ensinamentos e o carinho sempre!

Aos queridos Professores **Paulo Sergio Cerri** e **Estela Sasso Cerri**, por estarem sempre de portas abertas e prontos a ajudarem em qualquer circunstância! Agradeço a disponibilidade e disposição em compartilhar os ensinamentos e, em colaborarem na realização deste trabalho também ao disponibilizar seu laboratório para trabalho!

Ao **Prof. Dr. Carlos Rossa Junior**, grande colaborador no estabelecimento e desenvolvimento deste trabalho. Obrigado pela disponibilidade de sempre, e paciência dispensada durante os ensinamentos. Agradeço ainda, as oportunidades no desenvolvimento de outras atividades, as quais foram imprescindíveis em meu aprendizado!

Aos Professores Doutores do Curso de Pós-Graduação em Odontologia - Periodontia... **Adriana Marcantonio, Carlos Rossa, Daniela Zandin, Elcio Marcantonio, Joni Augusto, José Eduardo**

Sampaio, Morgana Rodrigues Guimarães Stabili, Silvana Regina Perez Orrico e Pedro Paulo Chaves de Souza. Agradeço pelo acolhimento e ensinamentos durante esses seis anos em Araraquara. Acompanharão sempre minha caminhada!

Às queridas amigas dos Departamentos de Diagnóstico e Cirurgia – Periodontia e Fisiologia e Patologia... *Dona Maria, Cláudia (Claudinha), Isabela (Isinha), Suleima (Su), Girlene (Lene), Romilda (Nina) e Sandra.* Agradeço toda atenção e disponibilidade em ajudar! Além da grandiosa cooperação no trabalho diário, sempre facilitando a caminhada, agradeço imensamente a amizade! Vocês são pessoas muito especiais e queridas! Estarão para sempre comigo!

Aos queridos *José Zuanon* e *Juliana Pirola* pela imprescindível e incomparável colaboração na realização deste trabalho, e pela amizade! Adoro vocês!

Aos Professores e toda equipe do Departamento de Fisiologia e Patologia.

Aos queridos *José Alexandre Garcia* e *Cristiano Afonso Lamounier*, pela acessibilidade e disponibilidade em atender toda e qualquer necessidade. São imprescindíveis! Obrigado pela paciência.

À Diretoria da FOAr-UNESP, agradeço a estrutura proporcionada à realização do Curso de Pós-Graduação.

A todos os funcionários da FOAr-UNESP que em vários momentos, e às vezes de forma anônima, fizeram a caminhada menos árdua. Muito Obrigado!

Ao CNPq (Processo 141788/2014-3) e FAPESP (Processo 2015/20281-0), pelo apoio financeiro, imprescindível ao decorrer do curso e desenvolvimento deste trabalho.

*“Agradeço a todas as dificuldades enfrentadas.
Não fossem por elas não teria saído do lugar. As facilidades
nos impedem de caminhar, e mesmo as críticas nos auxiliam,
e muito!”*

(Chico Xavier)

“Creio em mim mesmo. Creio naqueles que trabalham comigo, creio nos meus amigos e creio na minha família. Creio que Deus me emprestará tudo que necessito para triunfar, contanto que eu me esforce para alcançar com meios lícitos e honestos. Creio nas orações, e nunca fecharei meus olhos para dormir, sem pedir antes a devida orientação a fim de ser paciente com os outros e tolerante com os que não acreditam no que eu acredito. Creio que o triunfo é resultado de esforço inteligente, que não depende da sorte, da magia, de amigos, companheiros duvidosos ou de meu chefe. Creio que tirarei da vida exatamente o que nela colocar. Serei cauteloso quando tratar os outros, como quero que eles sejam comigo. Não caluniarei aqueles que não gosto. Não diminuirei meu trabalho por ver que os outros o fazem. Prestarei o melhor serviço de que sou capaz, porque jurei a mim mesmo triunfar na vida, e sei que o triunfo é sempre resultado do esforço consciente e eficaz. Finalmente, perdorei os que me ofendem, porque compreendo que às vezes ofendo os outros e necessito de perdão.”

Mahatma Gandhi

Gonçalves VP. Impacto de andrógenos sobre o processo de reparação tecidual e o mecanismo de reabsorção óssea [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

O propósito do trabalho foi avaliar o impacto da depleção de testosterona e sua administração exógena, bem como de drogas bloqueadoras dos receptores de andrógenos (flutamida) e estrógeno (fulvestranto), e inibidoras da conversão de testosterona em estradiol (anastrozol), sobre a reparação tecidual cutânea e reabsorção óssea inflamatória. Foram utilizados 80 ratos, divididos em 8 grupos (n=10/grupo): G1-Sem tratamento, G2-Durateston, G3-Orquiectomia (OQX), G4-OQX+Durateston; G5-Anastrozol, G6-Fulvestranto, G7-Flutamida, G8-Durateston+Anastrozol. Os animais foram submetidos aos diferentes tratamentos por um período de 15 dias e, em seguida, foi realizada a indução de ferida cirúrgica cutânea e reabsorção óssea em calvária durante mais 7 dias. Através dos cortes histológicos foi avaliada a contração das feridas, análise estereométrica e qualitativa do tecido de granulação e mensuração da formação de colágeno; e, ainda, foi realizada reação de imunohistoquímica para os anticorpos PCNA e KGF, e análise da resposta imunoinflamatória por ensaio multiplex. As calvárias foram submetidas a avaliação da porcentagem de tecido ósseo (% BV/TV) através da análise de micromotografia computadorizada (μ CT), quantificação do número de osteoclastos e pontos de reabsorção (lacunas de Howship) (H&E), marcação de osteoclastos TRAP+ (imunohistoquímica), e avaliação da resposta imunoinflamatória por ensaio multiplex. Foram utilizados ainda, 60 ratos divididos em 6 grupos (n=10/grupo): 1-Sham, 2-Sham+Ligadura, 3-Orquiectomia (OQX), 4-OQX+Ligadura, 5-OQX+Testosterona, 6-OQX+Testosterona+Ligadura. Os animais foram submetidos aos diferentes tratamentos de acordo com cada grupo e, em seguida, receberam ligadura ao redor dos primeiros molares inferiores, pelo período de 15 dias. Foram analisadas, a expressão de citocinas inflamatórias gengivais através de ensaio ELISA, análise estereométrica do processo inflamatório gengival e quantificação da reabsorção óssea inflamatória por μ CT. No modelo de reparo, o tratamento com durateston aumentou a porcentagem de matriz extracelular e vasos sanguíneos, a imunomarcagem para KGF e PCNA, estimulou uma maior contração das feridas, e elevou a produção de TNF- α e TGF- β 1 (p<0.05). A flutamida aumentou a proliferação de fibroblastos (imunomarcados por PCNA) e imunomarcagem para KGF, estimulou a contração das feridas (p<0.05) e, ainda, elevou a produção de TNF- α , TGF- β 1 e VEGF, e reduziu IL-6 e PDGF (p<0.05). No modelo de reabsorção óssea em calvária, a OQX aumentou o número de pontos

de reabsorção e de osteoclastos, assim como a atividade dos osteoclastos ($p < 0.05$), e o tratamento com durateston reduziu esses eventos e preservou o percentual de volume ósseo ($p < 0.05$). O número de pontos de reabsorção foi elevado pela flutamida, e a droga, assim como o fulvestranto, aumentaram a atividade de osteoclastos e elevaram a expressão de RANKL ($p < 0.05$). No modelo de periodontite experimental, a reabsorção óssea foi significativamente atenuada pela orquiectomia ($p < 0.05$). A periodontite experimental induziu um aumento significativo da interleucina IL-1 β , que foi reduzido pela orquiectomia. Os níveis de IL-6 não foram afetados pela OQX, mas foram significativamente reduzidos em animais orquiectomizados e tratados com testosterona. Os achados sugerem que níveis sub ou supra fisiológicos de testosterona circulante, em resposta ao bloqueio ou não dos receptores desses hormônios, alteram parte ou partes dos complexos eventos associados a formação do tecido de granulação e reabsorção óssea inflamatória.

Palavras-chave: Tecido de granulação. Reabsorção óssea. Periodontite. Inflamação. Androgênios. Ratos.

Gonçalves VP. Impact of androgens on the tissue repair process and the mechanism of bone resorption [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the impact of testosterone depletion and its exogenous administration, as well as androgen receptor blockers (flutamide) and estrogen (fulvestrant), and inhibitors of the conversion of testosterone to estradiol (anastrozol) on the cutaneous tissue repair and inflammatory bone resorption. Eighty rats were divided into eight groups (n=10/group): G1-No treatment, G2-Durateston, G3-Orchiectomy (OQX), G4-OQX+Durateston; G5-Anastrozol, G6-Fulvestrant, G7-Flutamide, G8-Durateston+Anastrozol. The animals were submitted to the different treatments for a period of 15 days and then the induction of cutaneous surgical wound and bone resorption in calvaria was performed for another 7 days. Through the histological sections the wound contraction, stereometric and qualitative analysis of the granulation tissue and measurement of collagen formation were evaluated; and also immunohistochemical reaction was performed for PCNA and KGF antibodies and analysis of the immunoinflammatory response by multiplex assay. The calvaria were submitted to evaluation of the percentage of bone tissue (% BV / TV) through computerized micromotography (μ CT) analysis, quantification of the number of osteoclasts and reabsorption points (Howship lacunes) (H&E), labeling of TRAP+ osteoclasts (immunohistochemistry), and evaluation of the immunoinflammatory response by multiplex assay. In addition, 60 rats were divided into 6 groups (n = 10 / group): 1-Sham, 2-Sham+Ligature, 3-Orchiectomy (OQX), 4-OQX+Ligation, 5-OQX+Testosterone, 6-OQX+Testosterone + Ligature. The animals were submitted to different treatments according to each group and then received ligature around the lower first molars, for a period of 15 days. It was performed the expression of gingival inflammatory cytokines by ELISA, stereometric analysis of the inflammatory gingival process and quantification of inflammatory bone resorption by μ CT. In the repair model, the durateston treatment increased the extracellular matrix and blood vessels percentage, the immunostaining for KGF and PCNA, stimulated a greater contraction of the wounds, and increased the production of TNF- α and TGF- β 1 (p <0.05). Flutamide increased the fibroblasts proliferation (immunolabelled by PCNA) and immunolabelling to KGF, stimulated wound contraction (p <0.05), and increased TNF- α , TGF- β 1 and VEGF production and reduced IL-6 and PDGF (p <0.05). In the calvariae bone resorption model, OQX increased the number of resorption points and osteoclasts, as well as

the activity of osteoclasts ($p < 0.05$), and the treatment with durateston reduced these events and preserved the percentage of bone volume ($p < 0.05$). The reabsorption points number was elevated by flutamide, and the drug, as well as fulvestrant, increased osteoclast activity and elevated RANKL expression ($p < 0.05$). In the experimental periodontitis model, bone resorption was significantly attenuated by orchiectomy ($p < 0.05$). Experimental periodontitis induced a significant increase in IL-1 β interleukin, which was reduced by orchiectomy. IL-6 levels were not affected by OQX, but were significantly reduced in orchiectomized and testosterone-treated animals. The findings suggest that sub- or supraphysiological levels of circulating testosterone, in response to or not blocking the receptors of these hormones, alter part or all of the complex events associated with granulation tissue formation and inflammatory bone resorption.

Keywords: Granulation tissue. Bone resorption. Periodontitis. Inflammation. Androgens. Rats.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Andrógenos – Síntese e Ação.....	17
2.2 Influência dos Andrógenos Sobre o Processo de Reparo Tecidual.....	18
2.3 Impacto dos Andrógenos Sobre a Perda Óssea Induzida por Processo Inflamatório.....	20
3 PROPOSIÇÃO	22
3.1 Hipótese	22
3.2 Objetivo.	22
4 PUBLICAÇÕES.....	23
4.1 Publicação 1	23
4.2 Publicação 2	51
4.3 Publicação 3	76
4.4 Publicação 4	102
4.5 Publicação 5	129
5 CONCLUSÕES	151
REFERÊNCIAS.....	152
APÊNDICE – Descrição do Material e Método (Publicações 1 a 5).....	156
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	170
ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	171
ANEXO C – Documentos Comprobatório (Submissão do artigo).....	172
ANEXO D – Documentos Comprobatório (Aceite do artigo).....	173
ANEXO E – Documentos Comprobatório (Autorização do periódico).....	174

1 INTRODUÇÃO

A lesão às células e tecidos resulta na ativação de uma série de eventos que imediatamente iniciam o processo de cura. Em tecidos saudáveis, a cura na forma de regeneração ou reparo, ocorre praticamente após qualquer injúria que cause destruição tecidual e é essencial para a sobrevivência do organismo. De modo geral, o processo de reparo consiste frequentemente em uma combinação de regeneração e formação de cicatriz. A relativa contribuição da regeneração e cicatrização no reparo tecidual depende da habilidade do tecido em regenerar-se e da extensão da lesão¹. A cura por reparo envolve eventos caracterizados pela complexa reação imunoinflamatória, controle e proliferação celular normal e do crescimento tecidual respeitando as especificidades inerentes a cada tecido lesado, sempre orquestrados por fatores biologicamente ativos e solúveis, como por exemplo as citocinas e fatores de crescimento^{2,3}.

A adequação da cura de feridas por reparação pode ser comprometida por fatores locais e sistêmicos que podem reduzir, retardar ou impedir o processo de cura^{1,4}. A depender das variadas condições experimentais, sugerem-se que tanto baixos quanto altos níveis de testosterona biodisponível atuam de maneira distinta na regulação de eventos participantes do complexo processo de reparo^{4,5,6,7,8,9,10}.

Ashcroft e Mills⁵ observaram, em homens, correlação negativa entre níveis elevados de testosterona e o processo natural de reparo de feridas. Por outro lado, alguns trabalhos que utilizam modelos murinos demonstram que a reparação de feridas cutâneas evolui mais rapidamente em animais com baixa disponibilidade de testosterona, enquanto a terapia com o hormônio favorece a angiogênese e prevenção de isquemia e necrose tecidual^{4,10,11}; e de modo semelhante, o tratamento sistêmico com antagonista do receptor de andrógeno (RA),

como por exemplo, a flutamida, atua acelerando a reparação tecidual e atenuando a resposta inflamatória^{4,5}.

Acrescido a essas informações, é inegável que ocorreram avanços substanciais na compreensão dos eventos que controlam o funcionamento de células e tecidos e, dos efeitos seletivos da testosterona, capazes de alterar e modular as funções celulares. Verificou-se de modo incontestável avanços significativos na compreensão de ação dos andrógenos, incluindo a testosterona, também sobre o metabolismo ósseo. Essa preeminência apoia-se nos receptores de testosterona presentes nas células que compõe esse tecido, assim como, nos efeitos diretos e indiretos marcantes no metabolismo dessas células ósseas^{8, 9, 12, 13, 14, 15}. Por fim, a elucidação do efeito da testosterona e de seus receptores sobre o processo de reparo e de reabsorção óssea faz desse hormônio um alvo potencial para a prevenção e conduta terapêutica de diversas condições patológicas a ele vinculadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Andrógenos – Síntese e Ação

Os hormônios sexuais masculinos (andrógenos) incluem a androstenediona (ASD), androstenediol (ADIOL), testosterona (T) e a dihidrotestosterona (DHT), sendo que a testosterona corresponde ao principal hormônio sexual masculino, e pode ser secretada diretamente pelos testículos (95%) ou sintetizada localmente em tecidos alvo através dos precursores dihidroepiandrosterona (DHEA) e dihidroepiandrosterona-sulfato (DHEAS), que secretados pelo córtex adrenal são convertidos em androstenediona e androstenediol e, posteriormente, em testosterona^{13, 16}. A ação da testosterona no local onde exercerá seu efeito biológico pode ocorrer diretamente através da ligação a receptores de andrógenos, ou indiretamente através de sua aromatização em estradiol (E2), atuando dessa maneira através de receptores de estrógeno - α e/ou - β , além dos receptores GPR30; e por outro lado, a DHT que é formada a partir da enzima 5- α -redutase, sendo metabolicamente mais ativa que a testosterona atua também através de receptores de andrógenos, e pode ser convertida reversivelmente por enzimas hidroxisteroide-desidrogenase aos metabólitos androstano ou androsterona (ADT)^{13, 16}.

Entretanto, diferentes modalidades e intervenções terapêuticas podem ser empregadas com o propósito de tratamento coadjuvante a diferentes condições patológicas, dentre elas câncer de mama masculino, próstata, hipogonadismo e, portanto, atuam modificando o nível sérico de testosterona como, por exemplo, populações de homens que sofrem declínio gradual dos níveis séricos de testosterona decorrente do envelhecimento¹⁷, indivíduos usuários de anabolizantes esteroidais androgênicos, que promovem doses hormonais suprafisiológicas no organismo¹⁸, além de homens que utilizam flutamida, uma

droga anti-androgênica, empregada como terapia associada ao tratamento de câncer de próstata¹⁹. Nesse contexto, há ampla diversidade de drogas, destacando-se por exemplo:

Durateston: Corresponde a um dos tipos de drogas para reposição hormonal exógena via parenteral, resultante da combinação de diferentes ésteres de testosterona que se distinguem quanto à meia-vida e, portanto, proporcionam duração mais prolongada dos níveis terapêuticos do medicamento²⁰.

Flutamida: Droga não-esteroidal com ação anti-androgênica, utilizada desde 1989 nos EUA para tratamento de câncer de próstata, que atua bloqueando a ligação de andrógenos aos seus receptores localizados nos tecidos-alvo²¹.

Fulvestranto: É uma droga com propriedade antagonista aos receptores de estrógeno, que promove alteração conformacional e degradação dos receptores de estrógeno e, conseqüentemente, atua bloqueando a ação do estradiol, sendo amplamente empregada como estratégia terapêutica do câncer de mama masculino^{22, 23, 24}.

Anastrozol: É um medicamento altamente específico e bem tolerado, que age inibindo ação da aromatase, enzima responsável pela conversão da testosterona em estradiol, sendo empregado quando a proporção de testosterona para estradiol é inferior a dez ou no tratamento da infertilidade masculina, pois é capaz de aumentar as concentrações séricas de testosterona, bem como a relação Testosterona/estradiol^{25, 26}. Ainda, sua atividade é pesquisada como possibilidade de terapia em homens com câncer de mama²⁷ (Losurdo et al., 2017).

2.2 Influência dos Andrógenos sobre o Processo de Reparo Tecidual

O processo de cicatrização e reparo do tecido cutâneo é dinâmico e altamente regulado por mecanismos celulares, humorais e moleculares, que se inicia diretamente após a lesão tecidual, podendo estender-se durante anos²⁸.

De acordo com Reinke e Sorg²⁸ a primeira fase do processo de reparo abrange a hemostasia e formação de uma matriz provisória à ferida, que ocorre imediatamente após a lesão, estando completa após algumas horas, e é acompanhada pela liberação de citocinas e fatores de crescimento que ativam o início do processo inflamatório, além de estimular a síntese de colágeno, ativação da transformação de fibroblastos em miofibroblastos e iniciar a angiogênese^{28,29}. Subsequente à etapa inicial instala-se a fase inflamatória, que caracteriza-se pelo recrutamento de neutrófilos e liberação de mediadores inflamatórios, estímulo de fatores de crescimento, e mais tardiamente, aproximadamente 3 dias após a injúria tecidual, macrófagos invadem a área de lesão e iniciam a fagocitose^{30,31}, além de secretarem fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas, que mantêm o processo de cicatrização intacto e atuam ativando a próxima fase de cicatrização de feridas, denominada proliferativa³².

Na fase de proliferação, que ocorre entre 3-10 dias após a injúria, o objetivo principal do processo de cicatrização e reparo reside em cobrir a superfície da ferida, formar tecido de granulação e restaurar a vascularização²⁸. Portanto, concomitante à migração de fibroblastos locais ao longo da rede de fibrina e do início da reepitelização a partir da migração de queratinócitos das bordas da ferida, há ativação da neovascularização e angiogênese^{33,34,35} e, ainda, há aumento da síntese de colágeno ao longo da ferida, enquanto a proliferação de fibroblastos diminui sucessivamente, mantendo o equilíbrio entre síntese e degradação da matriz extracelular²⁸.

Registros da literatura demonstram que em homens idosos, com declínio hormonal, o reparo de feridas ocorre de forma mais lenta comparativamente a mulheres, traduzindo-se pelo aumento da resposta inflamatória e conseqüente redução da deposição de matriz extracelular^{4,5,36}. Por outro lado, Ashcroft e Mills⁵ relatam que níveis elevados de testosterona em homens correlacionam-se de maneira inversa ao processo natural de reparo

de feridas e, ainda, em modelo experimental de reparo de feridas em ratos, a reparação evolui mais rapidamente em animais castrados, e conseqüentemente, com baixo nível hormonal⁴.

Um dos possíveis mecanismos de ação da testosterona sobre o reparo de feridas é relatado por Chenu¹⁰, que em seu trabalho verificou que a reposição de testosterona promove a revascularização cutânea e previne isquemia e necrose tecidual no processo de reparo cutâneo em camundongos castrados. Paralelamente, Romana-Souza¹¹ demonstram que a depleção de testosterona em camundongos promove redução do número de vasos sanguíneos e miofibroblastos, e acelera a reepitelização, comparando-se a animais com nível hormonal fisiológico. Lai³⁷ demonstram que em camundongos Knockout para receptores de andrógenos (RA) tanto em queratinócitos quanto fibroblastos, ocorre atraso no reparo cutâneo, porém a depleção de RA em queratinócito promove a reepitelização, enquanto em fibroblastos RA knockout tal processo é suprimido. Recente estudo aponta que em camundongos knockout para receptores de andrógenos (AR) há aumento da reepitelização cutânea e deposição de matriz de colágeno, enquanto in vitro, fibroblastos Knockout para AR apresentam aumento na taxa de proliferação e migração³⁸.

2.3 Impacto dos Andrógenos Sobre a Perda Óssea Induzida por Processo Inflamatório

O remodelamento ósseo é coordenado basicamente por dois mecanismos, formação e reabsorção óssea, que constituem processo essencial na homeostase do tecido ósseo³⁹. Basicamente, como descrito por Siddiqui e Partridge³⁹, a remodelação óssea inicia-se através de estímulo específico sobre osteoclastos que ativam a reabsorção e, concomitante, os osteoblastos iniciam sua atividade promovendo a deposição mineral e formação de tecido ósseo, havendo a substituição completa das células osteoclásticas por células osteoblásticas e manutenção da arquitetura e fisiologia óssea. Associados a atividade de osteoclastos e osteoblastos, bem como atuando direta ou indiretamente sobre os mesmos, há variados

mecanismos moleculares implicados no processo de remodelamento ósseo, abrangendo a ação fatores de crescimento e atividade do sistema RANKL-RANK-OPG.

Diversos fatores podem atuar sobre a fisiologia do tecido ósseo, no sentido de controlar e coordenar o remodelamento tecidual como, por exemplo, os hormônios sexuais; e, dessa maneira, alterações dos níveis hormonais podem ocasionar distúrbios no curso desse processo. Ainda, quadros de inflamação crônica também podem perturbar o metabolismo ósseo e promover o aumento da perda óssea⁴⁰. Dessa maneira, pressupõe-se que modificações nos níveis de testosterona influenciem na perda óssea associada a processos inflamatórios.

Registros da literatura demonstram que a deleção de receptores de andrógenos (RA) em camundongos resulta em elevado turnover ósseo, aumentando a reabsorção e reduzindo o volume ósseo cortical e trabecular, decorrente da diminuição da formação de tecido ósseo⁴¹ e, de maneira pertinente, outros estudos também demonstram que a inativação de RA eleva a atividade de reabsorção óssea e inibe a mineralização do tecido ósseo^{42, 43}, enquanto o papel dos receptores de estrógeno (RE) sobre o metabolismo ósseo é pouco elucidado^{44, 45}.

Nesse contexto, Famili⁴⁶ identificou em seu estudo que homens com câncer de próstata submetidos à terapia de deprivação hormonal são mais propensos a desenvolver doença periodontal crônica (80,5%) comparados a homens não submetidos à mesma terapia (3,7%). Em modelo de periodontite experimental em ratos, a depleção hormonal promove aumento da reabsorção óssea inflamatória, elevando o número de osteoclastos e a produção de IL-1 β , enquanto a administração in vitro de testosterona atua suprimindo a osteoclastogênese induzida pelo estímulo com RANKL^{9, 15}. Steffens⁹ relatou que o bloqueio de receptores de andrógenos promoveu elevada perda óssea alveolar, associada ao aumento de infiltrado inflamatório e número de osteoclastos, e redução de IL-6.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Hipótese

Aventamos a hipótese que drogas que atuam sobre o nível sérico de andrógenos, bem como a depleção desse hormonal, podem interferir tanto na formação do tecido de granulação implicado no reparo tecidual cutâneo, quanto na reabsorção óssea inflamatória.

3.2 Objetivo

Avaliar o impacto da depleção de testosterona e sua administração exógena, bem como de drogas bloqueadoras dos receptores de andrógenos (flutamida) e estrógeno (fulvestranto), e inibidoras da conversão de testosterona em estradiol (anastrozol) sobre a formação de tecido de granulação em modelo de reparo em ratos e, também, sobre o mecanismo de reabsorção óssea.

O trabalho foi dividido em publicações para facilitar a interpretação dos dados.

4 PUBLICAÇÕES

4.1 Publicação 1

Nível suprafisiológico de testosterona estimula a maturação do tecido de granulação*

Vinícius de Paiva Gonçalves¹, João Paulo Steffens², Carlos Rossa Junior¹, Luis C. Spolidorio³.

¹Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, SP, Brasil

²Departamento de Estomatologia, Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, PR, Brasil

³Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, SP, Brasil

Autor correspondente e endereço para correspondência: Luis Carlos Spolidorio, DDS, PhD. Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Rua. Humaitá, 1680 – Centro 14801-903, Araraquara – SP, Brasil. Tel: +55 (16) 3301-6479, Fax: +55 (16) 3301-6488 – lspolidorio@gmail.com

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca:

<http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaoatualizado.pdf>

RESUMO

O objetivo do trabalho foi investigar se os níveis sub ou suprafisiológico de testosterona afetam a formação do tecido de granulação de feridas cutâneas em ratos. Foram utilizados 40 ratos, divididos em 4 grupos experimentais: G1- Sem tratamento, G2- Durateston (DURA), G3- Orquiectomia (OQX) e G4- OQX+Durateston (OQX+DURA). No dia 0 os animais foram submetidos a orquiectomia e administração de testosterona, de acordo com cada grupo experimental, e após 15 dias foi realizada ferida cutânea no dorso dos ratos. Completado o período de 7 dias pós-cirúrgico, os animais foram eutanasiados para realização de biópsia excisional das feridas cutâneas e posterior processamento histopatológico. Foram avaliadas a contração das feridas (H&E), análise estereométrica e qualitativa do tecido de granulação (H&E e Tricrômico de Masson) e mensuração da formação de colágeno (PicroSirius), imunohistoquímica para os anticorpos PCNA e KGF, e análise da expressão de VEGF, IL-6, TNF- α , TGF- β 1, PDGF por ensaio multiplex. Os resultados mostraram que os tratamentos com DURA e OQX+DURA aumentou a porcentagem de matriz extracelular e vasos sanguíneos, a expressão de KGF, e estimulou uma maior contração das feridas ($p < 0.05$). A administração de durateston elevou a proliferação de fibroblastos (imunomarcados por PCNA) e a produção de TNF- α e TGF- β 1 ($p < 0.05$). A orquiectomia aumentou a concentração tecidual de VEGF e PDGF, e reduziu IL-6, TNF- α , TGF- β 1, enquanto a orquiectomia+durateston aumentou a expressão de IL-6 ($p < 0.05$). Os dados indicam que os níveis sub ou suprafisiológicos de testosterona circulantes influenciam na formação do tecido de granulação, demonstrando o nível suprafisiológico de testosterona estimular a maturação do tecido de granulação.

Palavras-chave: Tecido de granulação. Testosterona. Orquiectomia. Inflamação. Ratos.

INTRODUÇÃO

O processo de reparo de feridas cutâneas envolve uma série de complexos eventos, caracterizado por reação inflamatória, proliferação de fibroblastos, angiogênese e remodelação, tornando-se processo imprescindível na restauração da barreira dérmica e prevenção de infecção após lesão tecidual^{1, 2, 3}. A neoformação de matriz de tecido conjuntivo conduzida por fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais, que migram do tecido adjacente ou diferenciam-se a partir de células mesenquimais, possibilita restauração da função dérmica e fornece leito de apoio para a neoformação epitelial ou reepitelização^{4, 5, 6}. A reepitelização depende da produção de diferentes citocinas inflamatórias e fatores de crescimento originários tanto das células que compõe o tecido de granulação quanto das células da margem da ferida, sendo mediada principalmente por queratinócitos^{7, 8, 3}.

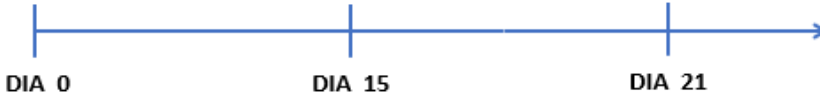
No entanto, fatores locais e sistêmicos podem modular o reparo de feridas retardando ou impedindo o processo de reparação^{1, 9, 10}. Um dos fatores parece estar associado às alterações hormonais, incluindo os hormônios androgênicos, como por exemplo a testosterona. Alguns relatos sugerem que altos ou baixos níveis de testosterona circulante possam influenciar negativamente a cronologia do período de reparação de feridas. Essa preeminência apoia-se na influência que esses hormônios exercem sobre células e produtos celulares que participam ativamente dos eventos iniciais do processo de reparo^{1, 10, 11, 12, 13}. Surpreendentemente poucos estudos investigam o impacto que as alterações dos níveis de testosterona causam sobre a formação do tecido de granulação de feridas cutâneas de modo geral, abrindo cenários de investigação em humanos e em animais de laboratório. No presente trabalho investigamos se níveis sub ou supra-fisiológicos de testosterona afetam a formação do tecido de granulação de feridas cutâneas em ratos.

MATERIAL E MÉTODO

Animais

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (Processo CEUA/FOAr #47/2014). Quarenta ratos machos (*Rattus norvegicus* albinos, Holtzman), 3-4 meses de idade, foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (n = 10/grupo), mantidos a uma temperatura de 23°C ±2, umidade de 65-75% e ciclo de luz controlado (12h luz-12h escuro), com ração e água disponível *ad libitum*. Os grupos e condições experimentais são demonstrados na Figura 1.

Figura 1- Representação da distribuição de ratos por grupo experimental.



GRUPOS	TRATAMENTO	INDUÇÃO DA FERIDA CUTÂNEA	EUTANÁSIA
G1 (n=10)	SEM TRATAMENTO	SIM	SIM
G2 (n=10)	DURATESTON	SIM	SIM
G3 (n=10)	OQX	SIM	SIM
G4 (n=10)	OQX+DURATESTON	SIM	SIM

OQX - Orquiectomia total (exposição, manipulação e remoção dos testículos). Todos os tratamentos foram iniciados 15 dias antes da indução da ferida cirúrgica.

Fonte: Elaboração própria.

Animais sem tratamento

Os animais deste grupo foram submetidos apenas ao procedimento cirúrgico para indução de ferida cutânea, e não foram castrados ou receberam tratamento com durateston representando, portanto, o grupo de animais com nível fisiológico de testosterona (Figura 1).

Orquiectomia

Resumidamente, 20 ratos (n=10/grupo) receberam anestesia com ketamina (1mL/Kg) e xilazina (0,4 mL/Kg) e, em seguida, sob condições estéreis, foi realizada incisão escrotal para remoção testicular bilateral, e em sequência sutura com fio reabsorvível. Os ratos receberam ketoflex (0,03 ml/rato, via intramuscular) para alívio da dor pós-operatória e uma combinação de sais de benzilpenicilina e estreptomicina (Pentabiótico/0,2ml/rato, via intramuscular). Após o procedimento, os animais foram mantidos em gaiolas separadas para recuperação durante uma semana (Figura 1). Esse procedimento foi realizado com o intuito de promover nível subfisiológico de testosterona nos animais.

Tratamento com testosterona (durateston)

Foi realizada semanalmente a administração de 250 mg/kg de Durateston (Schering-Plough) diluído em 0,1 ml de óleo de milho por via intramuscular¹⁴. O tratamento foi realizado até o final do período experimental (Figura 1). O tratamento foi realizado com o intuito de promover nível suprafisiológico de testosterona nos animais.

Análise do nível sérico de testosterona e Peso dos animais

Amostras de sangue caudal foram coletadas de cada animal no dia 0 (baseline), anterior à orquiectomia e administração de testosterona. No dia do sacrifício foram coletadas amostras de sangue de cada animal, por punção cardíaca, para avaliação da concentração hormonal final. O nível sérico de testosterona foi avaliado utilizando-se imunoensaio de quimioluminescência (Immulite 2000, Siemens Healthcare Diagnostics, Gwynedd, Reino Unido) no Laboratório de Análises Clínicas São Lucas/Araraquara-SP.

O peso dos animais também foi registrado no momento da eutanásia (dia 21) e avaliado comparativamente ao peso obtido no dia 0.

Indução da ferida cutânea

Após 15 dias do início dos tratamentos, os animais foram submetidos a anestesia com ketamina (1 mL/kg) e xilazina (0,4 mL/kg) para realização de procedimento cirúrgico para indução de ferida cutânea na região dorsal, localizada na linha média¹³. O animal foi colocado em decúbito esternal e após tricotomia, a antissepsia da região dorsal foi realizada com 2% de digluconato de clorexidina. Para a ressecção circular da pele, no centro da área depilada, as incisões foram feitas por rotação da borda cortante do punch metálico, medindo 0,6cm de diâmetro, até a exposição da fáscia muscular dorsal. As lesões permaneceram abertas, não recebendo nenhum tratamento oclusivo para que não interferisse na cicatrização, e a hemostasia foi realizada por compressão digital usando gaze estéril. Os ratos receberam acetaminofeno (300 mg/kg/peso corporal, via oral) para alívio da dor pós-operatória e uma combinação de sais de benzilpenicilina e estreptomicina (Pentabiótico/0,2 ml/rato, via intramuscular). Após 7 dias de indução da ferida cirúrgica (dia 21), os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico e os tecidos coletados para análise.

Eutanásia e coleta das amostras

Após o período experimental, todos os ratos foram eutanasiados por aprofundamento anestésico e as amostras das feridas coletadas e divididas ao meio. Metade foi fixada em solução de paraformaldeído a 4% durante 48 horas. Após a fixação, as peças foram lavadas em água corrente, desidratadas em série crescente de álcoois e diafanizadas em xilol. Após a diafanização, as peças foram incluídas em parafina, de forma padronizada para obtenção de cortes histológicos semi-seriados de 5 µm que foram corados com hematoxilina e eosina e tricrômico de masson e picrosirius red. A outra metade foi congelada a -80 ° para análise do perfil de citocinas inflamatórias através de ensaio multiplex.

Análise estereométrica

As imagens dos cortes microscópicos corados em H&E foram capturadas utilizando-se câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio de luz comumente transmitida e objetiva de 40x (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemanha). Uma grade de 32.400 μm^2 com 9×4 quadrados de 30 μm foi construída usando um software/editor de imagem (Adobe Photoshop CS5) e sobreposto nas imagens digitais obtidas dos cortes histológicos. As avaliações foram realizadas na região de transição de ferida/tecido normal, em lados opostos, considerando-se as duas bordas da ferida, além de um campo central da mesma. Um único examinador, previamente treinado e calibrado, realizou a análise estereométrica através da técnica de contagem de pontos. Foram determinados a densidade volumétrica de células inflamatórias, de fibroblastos (identificados como células fusiformes ou estreladas, núcleo ovóide ou alongado), matriz extracelular, figuras vasculares, e em cada grupo, a partir dos valores obtidos das medidas de cada animal foram estabelecidos as médias e os desvios padrão. A avaliação complementar foi realizada, através da análise qualitativa dos cortes corados por Tricrômico de Masson.

Mensuração do colágeno birrefringente (Picrosirius Red)

A densidade volumétrica (%) de colágeno nas regiões de borda e centro da ferida foi estimada a partir de cortes corados com solução a 0,1% de PicroSirius Red (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA). Os cortes foram analisados com filtros de polarização acoplados ao microscópio de luz (BX-51, Olympus, Tóquio, Japão). Foi utilizado 1 corte de cada animal, e 1 imagem foi capturada de cada uma das três regiões da ferida, como descrito anteriormente, com o auxílio de uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) e objetiva de 20x. Todas as imagens foram capturadas com parâmetros padronizados de

intensidade de luz, abertura do diafragma do condensador, altura do condensador, objetiva, angulação do polarizador e brilho da imagem. A quantidade de colágeno foi estimada utilizando-se metodologia previamente descrita na literatura¹⁵, através do processador de imagens ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), em que as cores proporcionadas pela birrefringência das imagens são isoladas utilizando-se o histograma de matiz disponível na guia “Color Threshold”. As imagens foram convertidas para preto e branco, de modo que cada pixel não preto se tornou branco e cada pixel preto permaneceu preto. Em seguida, a porcentagem ocupada por cada cor foi calculada a partir do número de pixels em cada faixa de matiz. Para esta mensuração, manipulou-se o histograma de matiz para selecionar cada comprimento de onda, ou seja, vermelho/alaranjado (matizes 2 a 38 e 230 a 256), amarelo (matiz 39 a 51) e verde (matiz 52 a 128). O número de pixels de cada frequência de cor foi expresso como porcentagem do total de colágeno birrefringente daquele comprimento de onda no total da imagem.

Análise da contração das feridas

Foi realizada a mensuração linear dos cortes histológicos das feridas cutâneas, com o objetivo de avaliar a contração das lesões. Os cortes histológicos corados em H&E foram fotografados usando microscópio de luz comumente transmitida e objetiva de 4x (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemanha) e, em seguida, foi realizada análise utilizando-se o software Image J. Foi traçada uma linha entre as bordas das feridas e, automaticamente, o software gerou a medida em micrômetros, e em cada grupo, a partir dos valores obtidos de cada mensuração por animal foram estabelecidos as médias e desvios padrão⁶.

Imunohistoquímica

A imunomarcagem do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e do fator de crescimento de queratinócitos (KGF) foram avaliadas por imunohistoquímica. O protocolo,

previamente padronizado, foi estabelecido para cada anticorpo: PCNA (1:50 - Invitrogen 133900) e KGF (1:25-ab131162-Abcam). As proteínas alvo foram detectadas utilizando-se o sistema DAB-estreptavidina (LSAB-2, Dako Cytomation) e, em seguida, os cortes foram corados com hematoxilina e as lamínulas montadas com Permount. As imagens foram capturadas através de câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada em um microscópio de luz comumente transmitida e objetiva de 40x (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemanha). A quantificação de células imunomarcadas (fibroblastos) foi realizada no tecido conjuntivo próximo as bordas da ferida e na área central para o anticorpo de PCNA, enquanto que para a quantificação de queratinócitos imunomarcados para o anticorpo KGF, apenas o epitélio das bordas da ferida foi considerado. Para a determinação do número de células em proliferação, foram consideradas aquelas com marcação positiva (marcação marrom) dentro dos campos selecionados.

Expressão de citocinas inflamatórias locais (MULTIPLEX)

A concentração tecidual de VEGF, IL-6, TNF- α , TGF- β 1 e PDGF foi avaliada por ensaio multiplex (Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho - LACTAD/UNICAMP - Campinas/SP). As amostras de proteínas totais foram extraídas com RIPA Lysis Buffer reagente, 10x (Merck, Millipore) e quantificadas pelo método BCA Protein Assay (Novagen, EMD Chemicals), de acordo com as instruções do fabricante. Para o ensaio multiplex, utilizou-se o Milliplex Kit (EMD Millipore), que fornece análise de diferentes analitos em um mesmo poço da placa, e o ensaio completo foi realizado de acordo com os protocolos de cada kit e as instruções do fabricante. Os resultados do ensaio foram normalizados dividindo-se pelos respectivos valores de proteína alvo obtidos na quantificação pelo método de ensaio de proteína BCA. Os dados gráficos foram expressos em fold-change.

Análise dos dados

Os dados foram submetidos aos testes de homogeneidade e distribuição usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, one-way ANOVA e o pós-teste de Tukey foram realizados para análise comparativa entre os grupos, e o teste t para comparar o nível de testosterona final e baseline, assim como para análise comparativa dos pesos dos animais. Todas as análises foram realizadas usando o software de análises estatísticas GraphPad Prism 6. Todos os testes foram aplicados com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

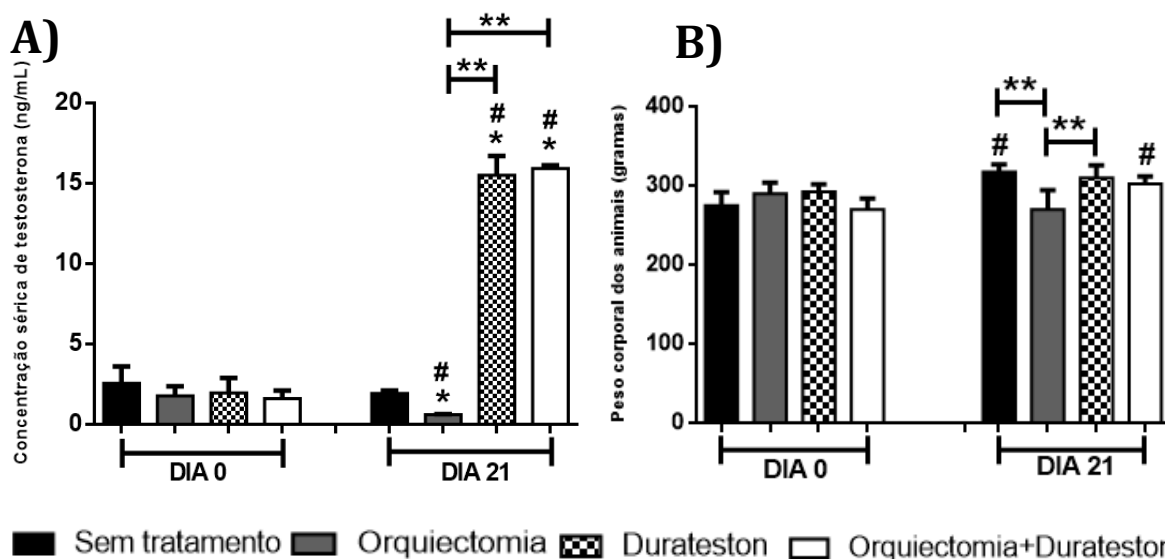
RESULTADOS

Concentração sérica de testosterona

Os valores de testosterona circulantes foram próximos entre todos os grupos no dia 0 ($p > 0,05$). Após orquiectomia, observou-se acentuada queda de testosterona quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). Os valores de testosterona circulantes dos grupos tratados com durateston foram acentuadamente maiores aos demais grupos ($p < 0,05$) (Figura 2A).

O peso corporal dos animais manteve-se uniforme entre todos os grupos, exceto no grupo de animais orquiectomizados que apresentaram redução significativa no peso quando comparados aos animais dos grupos sem tratamento e durateston ($p < 0,05$) (Figura 2B).

Figura 2 – Médias da concentração sérica de testosterona e peso dos animais.



A) Médias da concentração sérica de testosterona circulante (ng/mL) e B) Médias do peso corporal dos animais, no período inicial (dia 0) e 21 dias após orquiectomia, associada ou não com durateston. * $p < 0.05$ comparado ao grupo sem tratamento no dia 21, ** $p < 0.05$ comparado ao grupo orquiectomia no dia 21, # $p < 0.05$ comparando-se ao respectivo grupo no dia 0. Média (\pm DP).

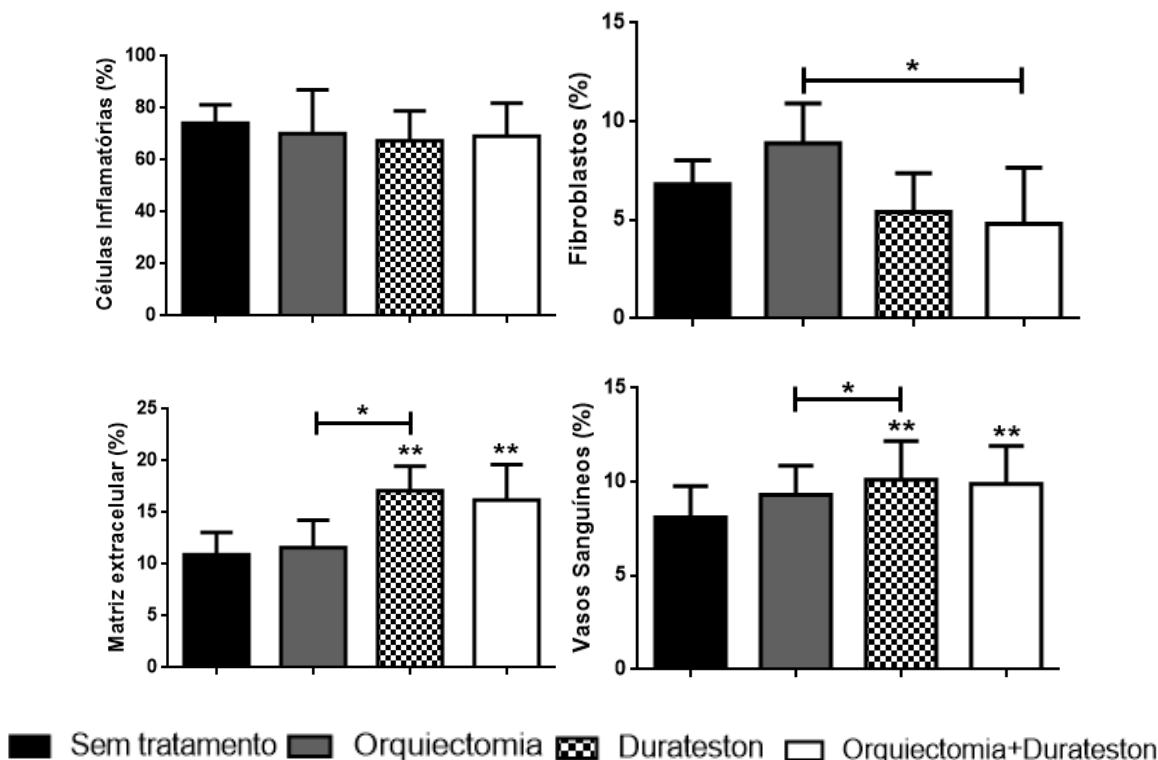
Fonte: Elaboração própria.

Administração de durateston favorece a formação de matriz extracelular e a revascularização

Após 7 dias a ferida cutânea de todos os grupos de ratos estava preenchida por tecido de granulação, caracteristicamente composto por infiltrado de células inflamatórias, fibroblastos, matriz extracelular e figuras vasculares, com variações quantitativas de cada componente conforme observados pela análise estereométrica. Em todos os grupos, observou-se predomínio de células inflamatórias, constituindo aproximadamente 70% do tecido de granulação, não havendo variações significativas do infiltrado leucocitário entre os grupos ($p > 0.05$). Nos animais do grupo controle e submetidos à orquiectomia o conteúdo de matriz extracelular correspondia a mais de 10% do tecido de granulação. O tratamento com durateston induziu significativo aumento da formação de matriz em ambos os grupos, comparando-se aos grupos sem tratamento e orquiectomia ($p < 0.05$). Comparativamente à composição de matriz extracelular, a formação de vasos sanguíneos também foi similar entre os grupos sem tratamento e orquiectomia, e aumentada de maneira significativa nos grupos

DURA e OQX+DURA, comparando-se aos grupos controle e submetidos à orquiectomia (OQX) ($p < 0.05$). A redução na formação de matriz extracelular e vasos sanguíneos no grupo OQX foi significativa apenas em relação ao grupo testosterona (DURA), não diferindo estatisticamente do grupo OQX+DURA. A presença de fibroblastos, em todos os grupos, corresponde a menor porcentagem de constituintes do tecido de granulação, no entanto, a ausência de testosterona (grupo OQX) promoveu aumento da produção das células fibroblásticas em relação aos demais grupos, de forma significativa comparado ao grupo OQX+DURA ($p < 0.05$). A testosterona exógena reduziu a produção de fibroblastos em ambos os grupos (DURA e OQX+DURA), comparativamente aos animais com nível fisiológico (sem tratamento) e ausência de testosterona (OQX) (Figuras 3 e 4). A análise estereométrica dos cortes corados por Tricrômico de Masson confirmou os achados referentes a formação de matriz extracelular observados nos cortes corados por H&E (Figura 5).

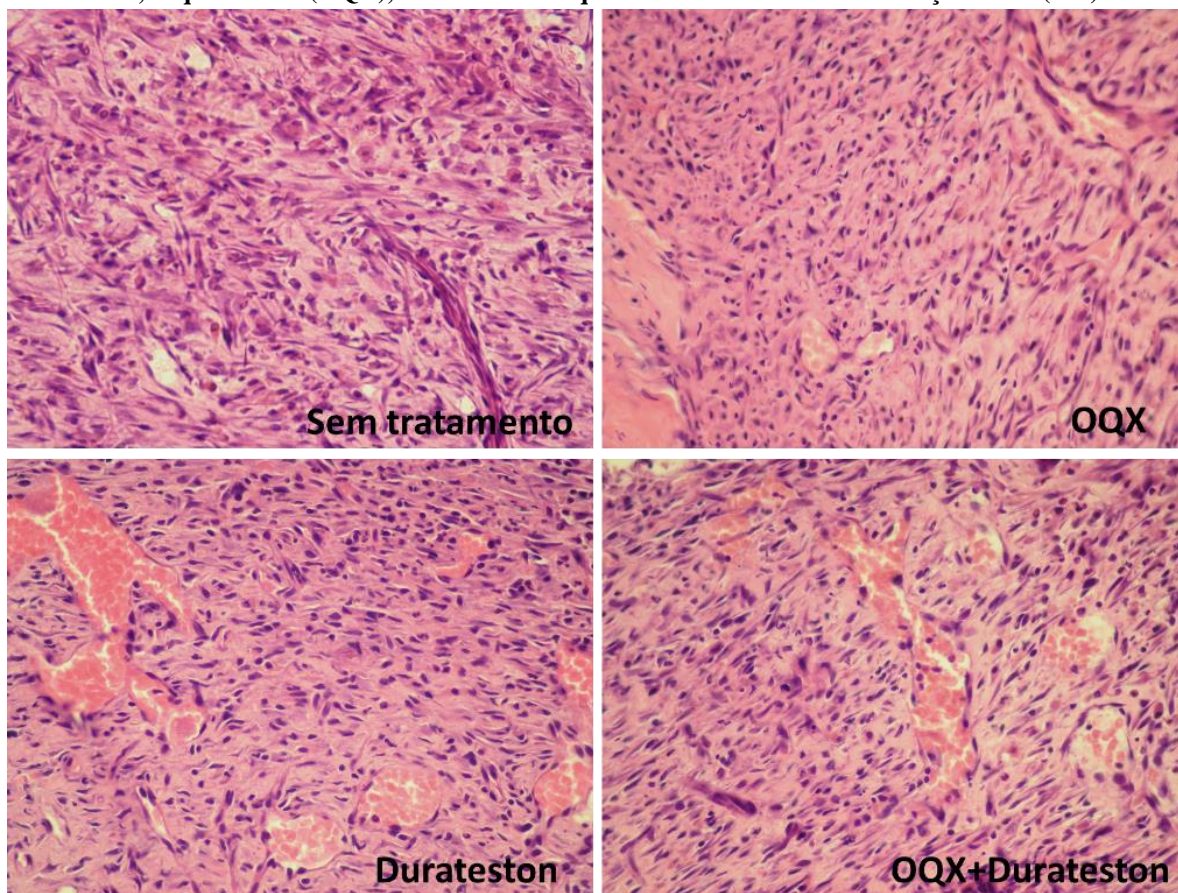
Figura 3 – Médias da análise estereométrica de células inflamatórias, fibroblastos, matriz extracelular e figuras vasculares do tecido de granulação (% \pm desvio padrão).



Os valores indicam redução da densidade volumétrica de fibroblastos e aumento da deposição de matriz extracelular e revascularização, pelo tratamento com durateston. * $p < 0.05$ em relação ao grupo orquiectomia, ** $p < 0.05$ em relação ao grupo sem tratamento. Média (\pm DP).

Fonte: Elaboração própria.

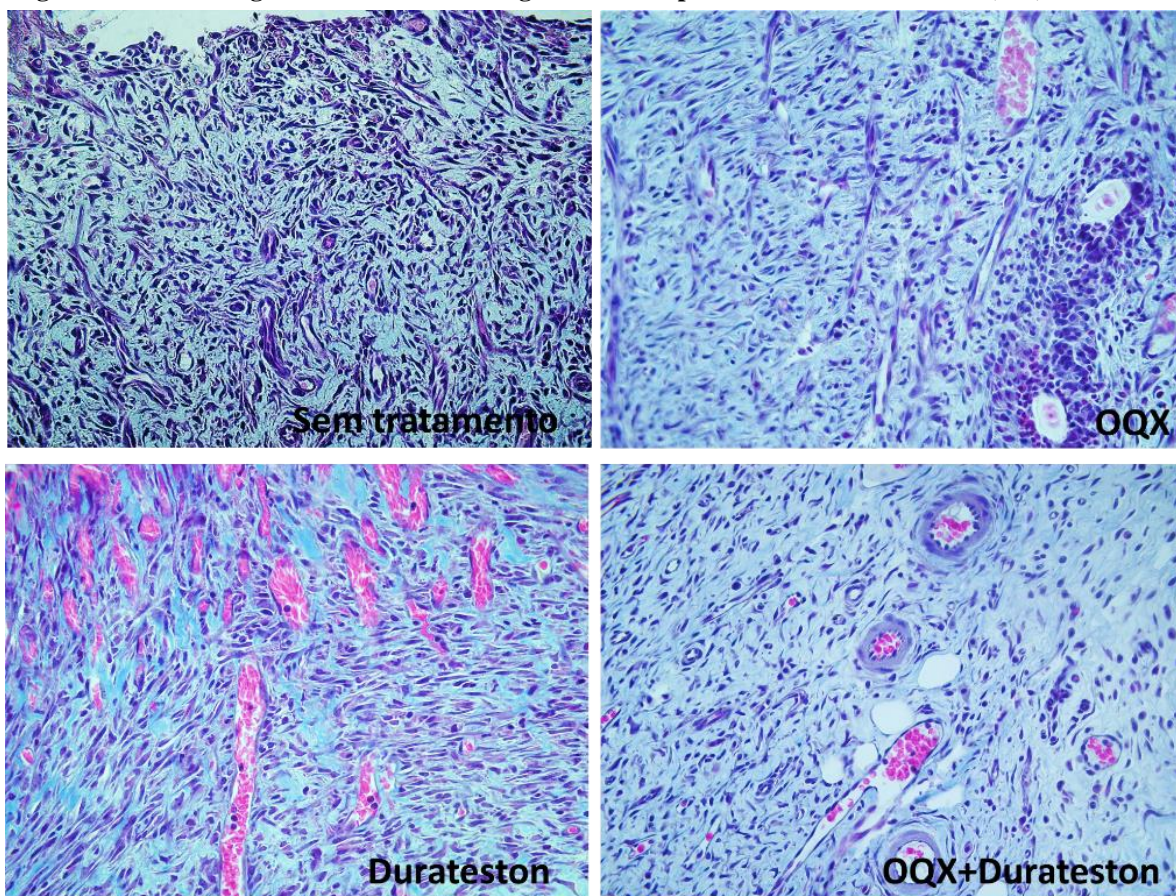
Figura 4 – Fotomicrografias representativas da análise estereométrica referente aos grupos sem tratamento, orquiectomia (OQX), durateston e orquiectomia+durateston. Coloração H&E (40x).



Pode-se observar formação de clássico tecido de granulação composto por células inflamatórias, fibroblastos, matriz extracelular e vasos sanguíneos.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 5 - Fotomicrografias de cortes histológicos corados por Tricrômico de Masson (40x).



Pode-se observar formação de clássico tecido de granulação composto por células inflamatórias, fibroblastos, matriz extracelular e vasos sanguíneos. A marcação em azul evidencia a formação de fibras constituintes da matriz extracelular.

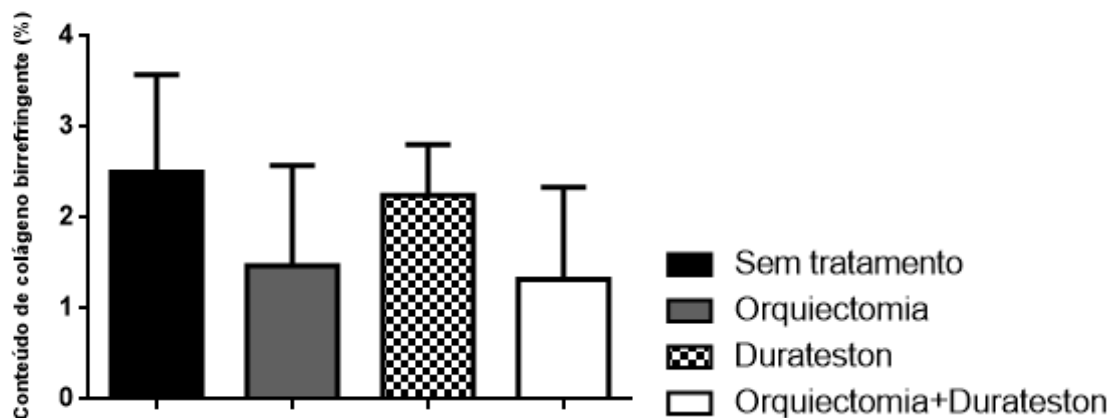
Fonte: Elaboração própria.

Redução hormonal acompanhada ou não da administração de durateston está associada a menor quantidade de deposição de colágeno

O tecido de granulação apresentou escassos e finos feixes de fibras de colágeno, distribuídos de maneira uniforme tanto em áreas de borda como centro da ferida. A mensuração das fibras colágenas birrefringentes, através da coloração PicroSirius Red, demonstrou que a redução hormonal, acompanhada ou não da administração de durateston (grupos OQX e OQX+DURA), está associada a menor produção de colágeno comparando-se ao grupo sem tratamento ($p>0.05$), no entanto, no grupo DURA a quantidade das fibras colágenas foi

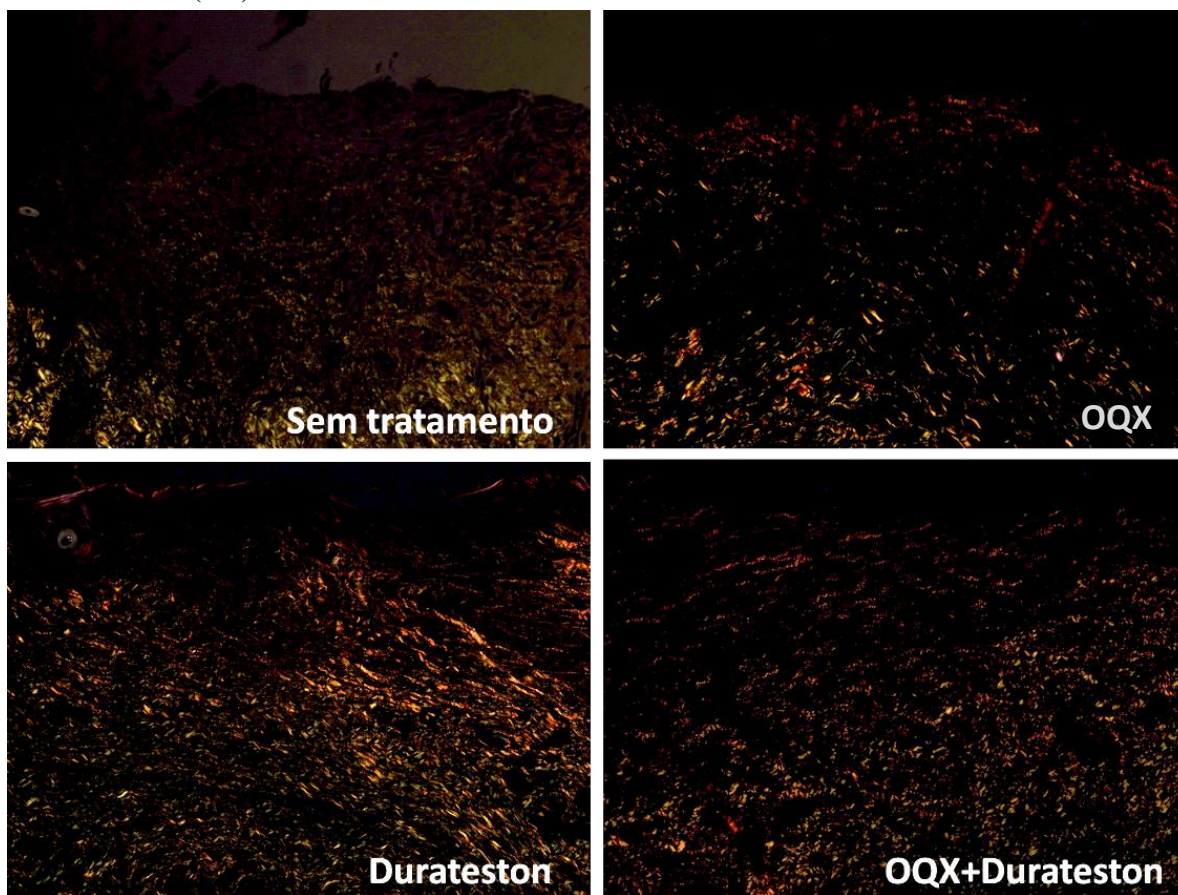
similar ao sem tratamento e, discretamente maior que naqueles grupos ($p>0.05$) (Figuras 6 e 7).

Figura 6 – Análise quantitativa de feixes de fibras de colágeno birrefringente nos cortes corados com PicroSirius Red.



Média e desvio-padrão das porcentagens de feixes de fibras colágenas, no tecido de granulação, referentes às regiões de borda e centro das lesões. Não houve diferença estatística entre os grupos. Média (\pm DP).
Fonte: Elaboração própria.

Figura 7 - Fotomicrografias representativas da análise quantitativa de feixes de fibras colágenas referentes aos grupos sem tratamento, orquiectomia (OQX), durateston e orquiectomia+durateston. Picrosirius Red (20x).

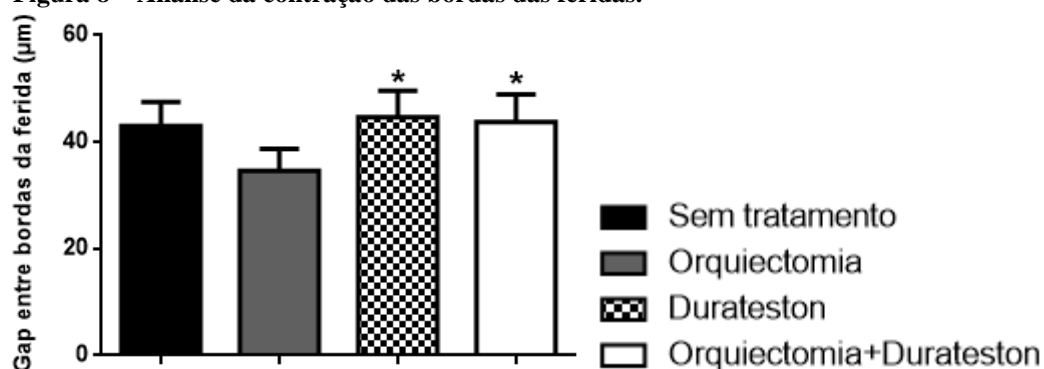


Os cortes foram analisados em microscópio com luz polarizada. Pode-se observar, em todos os grupos, fibras colágenas delgadas e em escassa quantidade.
Fonte: Elaboração própria.

Orquiectomia promove maior contração da ferida

Através da mensuração linear das feridas, observou-se que em ambos os grupos tratados com durateston, o gap entre as bordas da ferida foi maior, sendo similar ao observado no grupo sem tratamento ($p > 0.05$). Por outro lado, a orquiectomia foi capaz de reduzir a distância entre as bordas das lesões cutâneas, comparando-se aos grupos controle ($p > 0.05$) e DURA e OQX+DURA ($p < 0.05$) (Figuras 8 e 9).

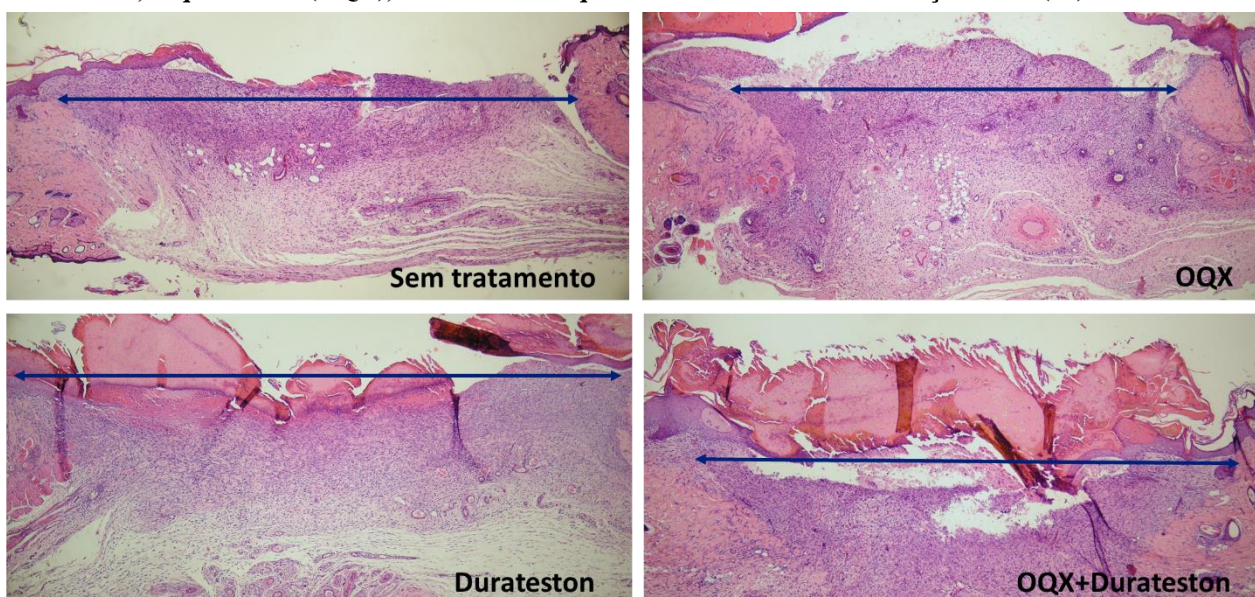
Figura 8 – Análise da contração das bordas das feridas.



Média e desvio-padrão da análise do gap entre as bordas das feridas, representando gaps maiores a uma menor contração da ferida. * $p < 0.05$ comparado ao grupo orquiectomia. Média (\pm DP).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 9 - Fotomicrografias representativas das feridas cutâneas dos ratos referentes aos grupos sem tratamento, orquiectomia (OQX), durateston e orquiectomia+durateston. Coloração H&E (4x)



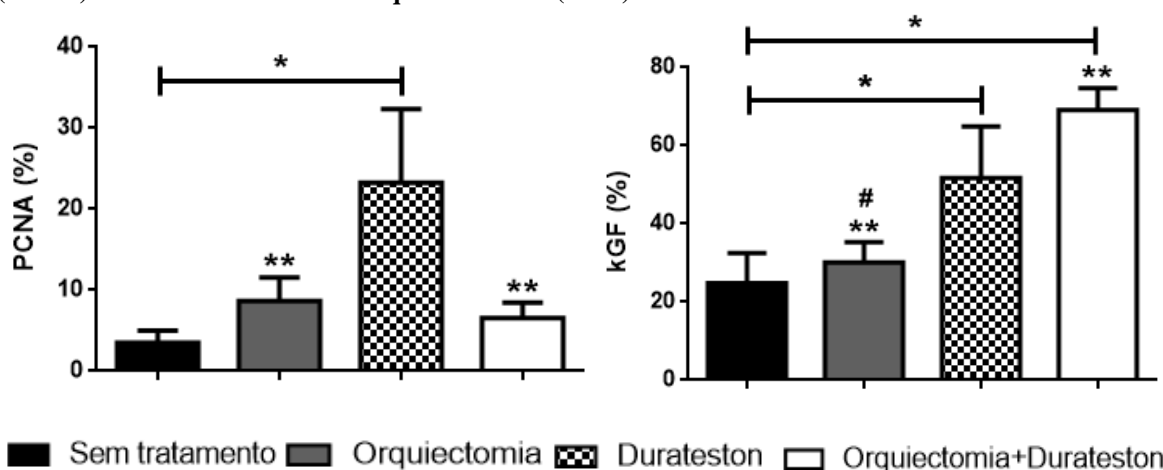
As linhas em azul demonstram o gap entre as bordas. Pode-se observar menor gap entre as bordas da ferida no grupo OQX.

Fonte: Elaboração própria.

A administração de durateston estimula a proliferação de fibroblastos e favorece o processo de reepitelização

Na imunomarcação do anticorpo PCNA, avaliou-se a proliferação de fibroblastos no tecido de granulação, observando-se reduzida atividade proliferativa celular nos grupos controle, OQX e OQX+DURA, que diferiram estatisticamente do grupo tratado com durateston (DURA), o qual apresentou acentuado aumento na proliferação fibroblástica ($p < 0.05$). Por outro lado, a imunomarcação do fator de crescimento em queratinócitos (KGF), que está relacionado ao processo de reepitelização, apresentou-se reduzida de maneira similar nos grupos sem tratamento e OQX ($p > 0.05$), diferindo-se significativamente dos grupos orquiectomia mais administração de durateston e a terapia com o hormônio (grupos DURA e OQX+DURA) ($p < 0.05$), os quais elevaram acentuadamente a imunomarcação do KGF, principalmente no grupo OQX+DURA que diferiu estatisticamente do grupo DURA ($p < 0.05$) (Figuras 10, 11 e 12).

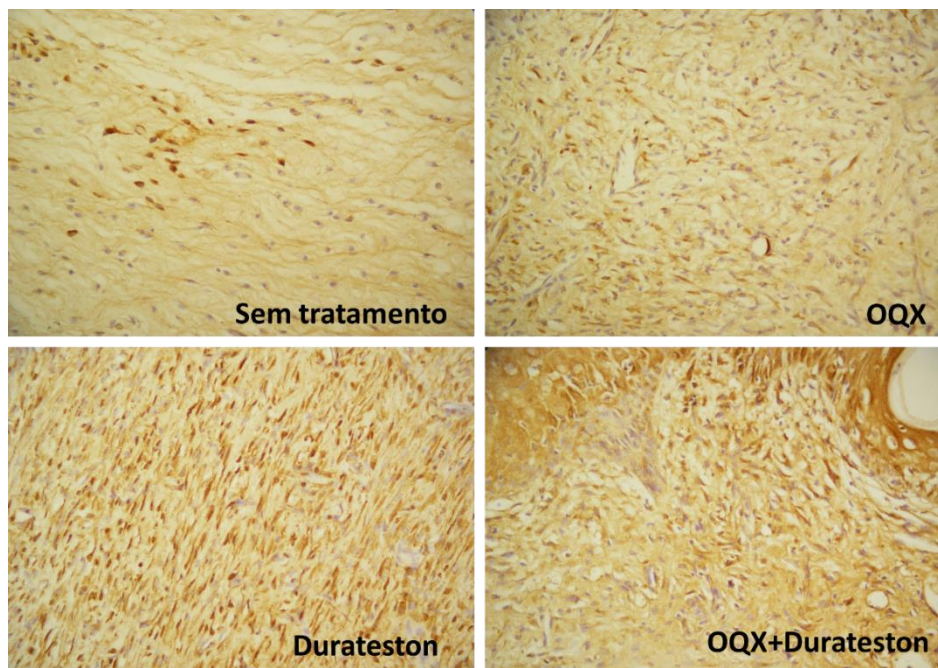
Figura 10 – Análise imunohistoquímica da expressão de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e fator de crescimento de queratinócitos (KGF).



* $p < 0.05$ comparado ao grupo sem tratamento, ** $p < 0.05$ comparado ao grupo durateston, # $p < 0.05$ comparado ao grupo OQX+durateston. Média (\pm DP).

Fonte: Elaboração própria.

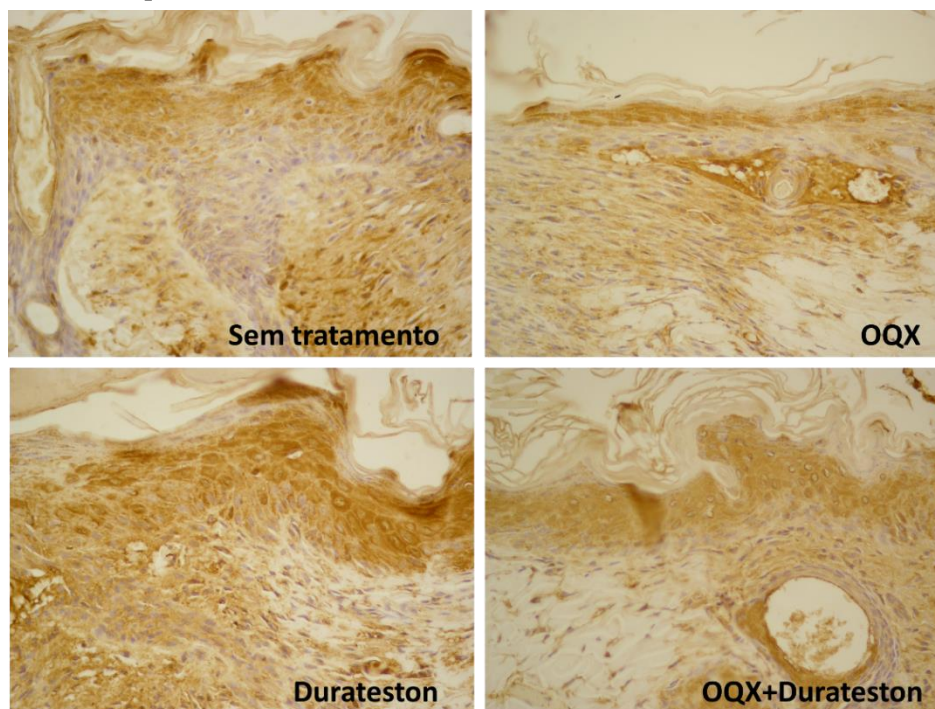
Figura 11 – Fotomicrografias de cortes histológicos corados por imunohistoquímica (40x).



Fotomicrografias representativas da reação de imunohistoquímica para o anticorpo PCNA, referentes aos grupos sem tratamento, orquiectomia (OQX), durateston e orquiectomia+durateston. Foram quantificados os fibroblastos imunomarcados em marrom, distribuídos no tecido de granulação.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 12 – Fotomicrografias de cortes histológicos corados por imunohistoquímica (40x).



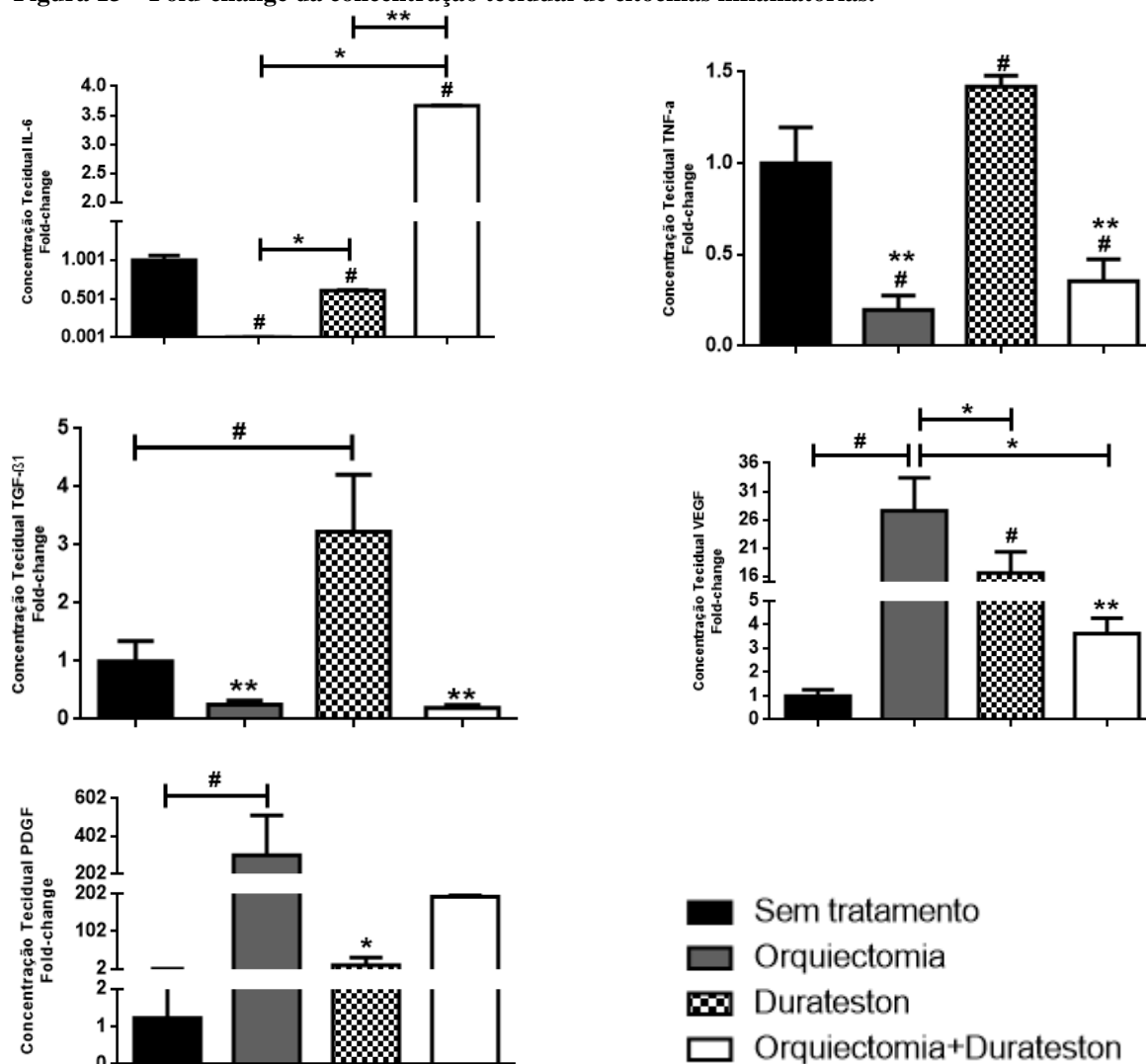
Fotomicrografias representativas da reação de imunohistoquímica para o anticorpo KGF, referentes aos grupos sem tratamento, orquiectomia (OQX), durateston e orquiectomia+durateston. Foram quantificadas as células imunomarcadas em marrom, distribuídas no tecido epitelial das bordas da ferida.

Fonte: Elaboração própria.

A depleção de testosterona reduz o processo inflamatório associado a formação do tecido de granulação

O nível subfisiológico de testosterona (grupo OQX) elevou significativamente a expressão de VEGF e PDGF, enquanto a concentração de IL-6, TNF- α e TGF- β 1 foi acentuadamente reduzida pela orquiectomia ($p < 0.05$). Por outro lado, a dose supra-fisiológica de testosterona (grupo Durateston) promoveu aumento significativo de VEGF, PDGF, TNF- α e TGF- β 1, e reduziu IL-6 ($p < 0.05$). A orquiectomia associada à administração de durateston, elevou a concentração tecidual de VEGF, PDGF e IL-6, e diminuiu a expressão de TNF- α e TGF- β 1 ($p < 0.05$) (Figura 13).

Figura 13 – Fold-change da concentração tecidual de citocinas inflamatórias.



* $p < 0.05$ em relação ao grupo orquiectomia, ** $p < 0.05$ comparado ao grupo durateston, # $p < 0.05$ comparado ao sem tratamento.

Fonte: Elaboração própria.

DISCUSSÃO

O propósito do presente trabalho foi fundamentado na hipótese de que níveis subfisiológicos ou suprafisiológicos de testosterona circulante possam modular a formação de tecido de granulação induzido em ferida cutânea. Foi utilizado um clássico modelo de ferida cirúrgica cutânea no dorso de ratos para induzir a formação de tecido de granulação. O período para o desenvolvimento ou estabelecimento dos parâmetros clínicos dos efeitos supra e subfisiológicos da testosterona é variável em diferentes espécies de animais e em diferentes indivíduos da mesma espécie. Portanto, para se estabelecer níveis de testosterona circulante desejado, o monitoramento sérico é importante e pode ser feito através de imunoensaio de quimioluminescência conforme foi realizado no presente trabalho. A orquiectomia e a dose de 250 mg/kg de peso corporal de durateston, utilizados no presente trabalho, confirmaram os achados de trabalhos anteriores, os quais demonstraram que a concentração sérica sub ou supra fisiológica resultante, mostraram-se bem toleradas^{14, 16, 17}. Praticamente todos os procedimentos cirúrgicos ou administração de drogas, tem efeitos secundários muitas vezes indesejáveis. Em todos os casos, deve-se ressaltar que seus benefícios suplantam em muito os efeitos indesejáveis. Em condições de normalidade, a multiplicidade de eventos envolvidos na formação do tecido de granulação, como ponto importante na reparação de feridas, é complexa e sugere-se que hormônios de maneira geral, incluindo a testosterona atue nesses eventos de maneira seletiva. No presente trabalho, os componentes do tecido de granulação responderam de forma distinta ao impacto induzido pelos níveis sub e suprafisiológico de testosterona. Os resultados estereométricos mostraram que níveis sub ou supra fisiológicos de testosterona não influenciaram a reação inflamatória, que é uma fase de relevante importância e própria da formação do tecido de granulação. Os achados referentes ao processo inflamatório parecem estar dissociados à queda ou aumento dos níveis de testosterona. A resposta inflamatória aos baixos níveis de testosterona circulantes não

está alinhada aos achados de Kamis e Ibrahim¹⁸, Yao et al.¹⁹; Gilliver et al.¹, Torres-Chávez et al.²⁰ e Romana-Souza et al.¹³ que verificaram importantes efeitos antiinflamatórios ou imunossupressores em protocolos com animais orquiectomizados. Por outro lado, nossos resultados não mostram tendência de alteração da resposta inflamatória com o tratamento de indução do aumento do nível de testosterona circulante. A elevada concentração de testosterona circulante mostra-se associada a acentuada perda óssea periodontal em ratos¹⁶, aventando-se que a testosterona possua propriedade imunossupressora, como verificado pelo efeito supressor do hormônio sobre a contagem de leucócitos em camundongos orquiectomizados e ratos jovens^{18, 19}. De modo semelhante, o uso de anabolizantes esteroidais por homens está relacionada a formas mais severas de periodontite²¹.

Por outro lado, os resultados mostraram que a densidade volumétrica de fibroblastos, matriz extracelular e figuras vasculares foram marcadamente heterogêneos. Verificou-se que a densidade volumétrica de matriz extracelular e de vasos sanguíneos não acompanharam a celularidade do tecido de granulação, isto é, foram inversamente proporcionais à densidade volumétrica de fibroblastos. Parte dos achados do presente trabalho estão de acordo aos resultados de Mukudai et al.²² que observaram redução da proliferação de fibroblastos pela terapia com testosterona, e tendência em apresentar queda produção de matriz extracelular em cordas vocais de ratos castrados. Interessante salientar que quando se avaliou-se somente feixes de fibras de colágeno dentre todos os componentes presentes na matriz extracelular, não detectou-se significativas diferenças no período experimental analisado. Esses resultados estão alinhados aos resultados de Bertolo et al.²³ e Hofer et al.²⁴.

A avaliação da atividade proliferativa de fibroblastos feita pela imunomarcação do anticorpo *PCNA*, mostrou-se sensível ao tratamento com durateston, quando comparado aos outros tratamentos. No estágio atual do nosso conhecimento, não existem dados na literatura pertinente, avaliando a atividade proliferativa de fibroblastos associada ao impacto sistêmico

dos níveis sub ou suprafisiológico de testosterona circulante, o que denota o ineditismo dos dados.

Sabe-se que em ratos há interação entre hormônios circulantes e fibroblastos, especialmente os gengivais. Nesses casos os fibroblastos podem metabolizar testosterona produzindo 5 α -dihidrotestosterona que poderia agir nas subpopulações de fibroblastos gengivais e causar aumento da síntese de colágeno e/ou diminuição da atividade da colagenase, induzindo aumento gengival. Podemos aventar a hipótese que fibroblastos da derme não respondem da mesma forma e que nível elevado de testosterona estimule a atividade dos fibroblastos e, conseqüentemente, a síntese de produtos que compõe a matriz extracelular que não somente feixes de fibras de colágeno. Estudos in vivo e in vitro sobre a atividade de células que compõe o tecido de granulação, associados aos níveis suprafisiológicos de testosterona são escassos e apontam divergências, mostrando trabalhos cujos resultados experimentais não são conclusivos. Na análise estereométrica feita em preparados histológicos, ao nível de microscopia de luz transmitida, as estruturas mais proeminentes (opacas) são superestimadas correspondendo ao efeito Holmes, que na execução de métodos estereométricos deve ser considerado. Portanto, o efeito Holmes é um erro sistemático associado a espessura do corte e ao diâmetro do componente estudado²⁵. A dimensão do erro depende da razão entre o diâmetro da estrutura examinada e a espessura do corte. Segundo Anderson e Lowe²⁶, não há necessidade em aplicar-se o efeito Holmes em estudos comparativos da mesma estrutura tecidual, desde que as espessuras sejam constantes. Essas observações justificam ausência de cálculo de erro neste experimento, assim como não utilização de cortes semifinos. Tem-se que levar em consideração, entretanto, que cortes semifinos aumentam a resolução e conseqüentemente a confiabilidade da análise estereológica²⁷.

No processo de reparo, a angiogênese constitui mecanismo fundamental na formação do tecido de granulação e, como descreveram Gonçalves et al.²⁸ o aumento da vascularização é

essencial para as atividades celulares, estando diretamente relacionada à deposição de novos componentes da matriz, promovendo suprimentos necessários ao tecido neoformado, e garantindo a função dos fibroblastos e demais células implicadas na reparação. No presente trabalho, o tratamento com durateston induziu elevada e significativa porcentagem de vasos sanguíneos. Embasando nossos resultados, recentes registros na literatura apontam que a administração de testosterona aumenta a vascularização cardíaca em ratos castrados ou não^{29, 30}. Em modelo de reparo cutâneo em ratos, Chenu et al.¹⁰ observaram que em ratos castrados o restabelecimento do fluxo sanguíneo foi reduzido, levando à isquemia e necrose tecidual, enquanto em animais controle e castrados acompanhados de administração de testosterona a revascularização foi igualmente restabelecida.

Diante da heterogeneidade das respostas celulares vistas às alterações dos níveis de testosterona circulante, podemos pensar que diferentes mecanismos de controles funcionais decorrentes do processo inflamatório e da fase de deposição de matriz extracelular especificamente de feixes de fibras de colágeno, podem estar atuando na compensação das alterações de eventuais efeitos secundários. Diversos mediadores da inflamação, como citocinas pró e anti-inflamatórias e fatores de crescimento, atuam coordenando a reparação, ativando o processo inflamatório, estimulando a síntese de colágeno e iniciando a angiogênese^{31, 8}. A avaliação da resposta das células que participam da formação do tecido de granulação também foi realizada através da análise de IL-6, TNF- α , TGF- β 1, VEGF e PDGF. A expressão de VEGF e PDGF foi elevada nos diferentes grupos experimentais, principalmente no grupo orquiectomizado e, a mesma intervenção diminuiu drasticamente o nível tecidual de TGF- β 1 e TNF- α mesmo após a administração do durateston. O nível tecidual de IL-6 diminuiu nos tecidos dos animais do grupo orquiectomizado e do grupo tratado apenas com durateston. Entretanto, os resultados mostram que quando os animais orquiectomizados foram tratados com durateston, os níveis de IL-6 foram restabelecidos.

Tais informações indicam que os diferentes fatores de crescimento e citocinas avaliados, são estimuladas ou não em resposta à variação hormonal. Gilliver et al.¹ também verificaram em modelo de reparo cutâneo, que a orquiectomia reduz a expressão de TGF- β 1, TNF- α e IL-6, o que embasa nossos achados. Têm-se que levar em consideração que inúmeros fatores bioquímicos estão envolvidos na formação do tecido de granulação e, os dados da literatura pertinente são escassos e merecem serem investigados. Apesar de realizados em condições distintas ao nosso trabalho Montico et al.³² e Chodari et al.²⁹ verificaram aumento da expressão de VEGF em condições subfisiológicas de testosterona e na reposição hormonal. Por outro lado, nossos resultados estão de acordo com Hofer et al.²⁴ que avaliaram o processo inflamatório em modelo de reparo tecidual em uretra de ratos e observaram que a castração reduziu o perfil inflamatório, diminuindo a expressão de PDGF, TGF- β 1 e TNF- α , condição essa revertida pela administração de testosterona nos animais. Resultados conflitantes são reportados a respeito da relação entre a expressão de citocinas e testosterona¹⁶, sendo relatados na literatura achados mostrando que a baixa concentração de testosterona não afeta a produção de IL-6 durante inflamação periodontal em ratos¹⁶, ausência de correlação entre a terapia com o hormônio e a expressão de IL-6 e TNF- α em homens idosos³³ e, ainda, que a terapia com testosterona em homens com hipogonadismo reduz significativamente a expressão de TNF- α , mas não possui efeito sobre os níveis de IL-6³⁴.

Subsequente a formação e maturação do tecido de granulação, a atividade de queratinócitos nas bordas da ferida iniciam o processo de reepitelização, ativado por diferentes vias de sinalização que atuando sobre células epiteliais promovem a liberação de uma série de citocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento em queratinócitos (KGF)³¹.

⁸. Verificamos que a porcentagem de células que expressam KGF foi similar entre os grupos de ratos sem tratamento e orquiectomizado, enquanto o tratamento com durateston elevou significativamente a marcação do fator de crescimento, sugerindo que a testosterona possa

atuar acelerando o processo de reepitelização sobre a ferida cutânea. Por fim, a mensuração linear das bordas da ferida foi realizada, e foi verificado que a administração hormonal em animais orquiectomizados ou não, comprometeu de maneira significativa a contração da ferida, demonstrando o potencial da concentração suprafisiológica de testosterona em retardar a completa resolução da ferida. No entanto, é necessário considerar o período avaliado de 7 dias pois, como também observado por Gonçalves et al.²⁸ em modelo de reparo cutâneo, a contração da ferida é aumentada pela administração de testosterona após o período de 14 dias, mantendo-se reduzida no período inicial de 7 dias.

Os resultados alcançados são comparáveis a literatura, no que diz respeito a avaliação dos mecanismos de ação e efeitos da variação nos níveis de testosterona sobre o curso da formação do tecido de granulação. Contudo, ressalta-se que é necessário considerar as diferenças metodológicas dos diferentes trabalhos, o tipo de droga utilizada, e período avaliado, transferindo e analisando de forma cautelosa os achados, que em conjunto contribuem com a elucidação sobre o assunto, esclarecendo pontos divergentes de outros já observados na literatura, porém não implicando de maneira conclusiva sobre seu total esclarecimento. De modo geral, tanto a concentração subfisiológica de testosterona quanto suprafisiológica, podem agir no processo de formação do tecido de granulação e, eventualmente, interferir em sua progressão.

CONCLUSÃO

Os dados indicam que os níveis sub ou suprafisiológico de testosterona circulantes influenciam na formação do tecido de granulação, demonstrando o nível suprafisiológico de testosterona estimular a maturação do tecido de granulação.

REFERÊNCIAS

1. Gilliver SC, Ashworth JJ, Mills SJ, Hardman MJ, Ashcroft GS. Androgens modulate the inflammatory response during acute wound healing. *J Cell Sci.* 2006; 119(Pt 4): 722-32.
2. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med.* 2014; 6(265): 265sr6.
3. Zhang C, Ponugoti B, Tian C, Xu F, Tarapore R, Batres A, et al. FOXO1 differentially regulates both normal and diabetic wound healing. *J Cell Biol.* 2015; 209(2): 289-303.
4. Lee CH, Shah B, Moioli EK, Mao JJ. CTGF directs fibroblast differentiation from human mesenchymal stem/stromal cells and defines connective tissue healing in a rodent injury model. *J Clin Invest.* 2010; 120(9): 3340-9.
5. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012; 18(7): 1028-40.
6. Zhang C, Lim J, Liu J, Ponugoti B, Alsadun S, Tian C, et al. FOXO1 expression in keratinocytes promotes connective tissue healing. *Sci Rep.* 2017; 7: 42834.
7. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol.* 2007; 127(5): 998-1008.
8. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg. Res.* 2012; 49(1): 35-43.
9. Robson MC, Steed DL, Franz MG. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg.* 2001; 38(2): 72-140.
10. Chenu C, Adlanmerini M, Boudou F, Chantalat E, Guihot AL, Toutain C, et al. Testosterone Prevents Cutaneous Ischemia and Necrosis in Males Through Complementary Estrogenic and Androgenic Actions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017; 37(5): 909-19.
11. Ashcroft GS, Greenwell-Wild T, Horan MA, Wahl SM, Ferguson MW. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. *Am J Pathol.* 1999; 155: 1137-46.
12. Ashcroft GS, Mills SJ. Androgen receptor-mediated inhibition of cutaneous wound healing. *J Clin Invest.* 2002; 110(5): 615-24.
13. Romana-Souza B, Assis de Brito TL, Pereira GR, Monte-Alto-Costa A. Gonadal hormones differently modulate cutaneous wound healing of chronically stressed mice. *Brain Behav Immun.* 2014; 36: 101-10.

14. Steffens JP, Coimbra LS, Ramalho-Lucas PD, Rossa C Jr, Spolidorio LC. The effect of supra and subphysiologic testosterone levels on ligature-induced bone loss in rats — a radiographic and histologic pilot study. *J Periodontol.* 2012; 83(11): 1432-9.
15. Fonseca TS. Resposta tecidual induzida por Biodentine e MTA Branco em subcutâneo de ratos [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.
16. Steffens JP, Herrera BS, Coimbra LS, Stephens DN, Rossa C Jr, Spolidorio LC, et al. Testosterone regulates bone response to inflammation. *Horm Metab Res.* 2014; 46(3): 193-200.
17. Steffens JP, Coimbra LS, Rossa C Jr, Kantarci A, Van Dyke TE, Spolidorio LC. Androgen receptors and experimental bone loss - an in vivo and in vitro study. *Bone.* 2015; 81:683-90.
18. Kamis AB, Ibrahim JB. Effects of testosterone on blood leukocytes in plasmodium berghei-infected mice. *Parasitol Res.* 1989; 75(8): 611–3.
19. Yao G, Liang J, Han X, Hou Y. In vivo modulation of the circulating lymphocyte subsets and monocytes by androgen. *Internat Immunopharmacol.* 2003; 3(13-14): 1853–60.
20. Torres-Chávez KE, Sanfins JM, Clemente-Napimoga JT, Pelegrini-Da-Silva A, Parada CA, Fischer L, et al. Effect of gonadal steroid hormones on formalina-induced temporomandibular joint inflammation. *Eur J Pain.* 2012; 16(2): 204-16.
21. Brusca MI, Verdugo F, Amighini C, Albaina O, Moragues MD. Anabolic steroids affect human periodontal health and microbiota. *Clin Oral Investig.* 2014; 18(6):1579-86.
22. Mukudai S, Matsuda KI, Nishio T, Sugiyama Y, Bando H, Hirota R, et al. Differential responses to steroid hormones in fibroblasts from the vocal fold, trachea, and esophagus. *Endocrinology.* 2015; 156(3): 1000-9.
23. Bertolo A, Baur M, Aebli N, Ferguson SJ, Stoyanov J. Physiological testosterone levels enhance chondrogenic extracellular matrix synthesis by male intervertebral disc cells in vitro, but not by mesenchymal stem cells. *Spine J.* 2014; 14(3): 455-68.
24. Hofer MD, Cheng EY, Bury MI, Xu W, Hong SJ, Kaplan WE, et al. Androgen supplementation in rats increases the inflammatory response and prolongs urethral healing. *Urology.* 2015; 85(3): 691-7.
25. Weibel E, Elias H. Quantitative methods in morphology. In: Weibel ER, Elias H. Introduction to stereology and morphology. Berlin: Springer Verlag; 1967. p. 3-19.
26. Anderson LJ. Hystometric and image analysis. In: Bancroft JD e Stevens A. Theory and practice of histological technics. 3rd. Londres: Livingstone; 1990. p. 597-618.
27. Weibel ER. Stereological methods. New York: Academy Press; 1979.

28. Gonçalves RV, Novaes RD, Sarandy MM, Damasceno EM, da Matta SL, de Gouveia NM, et al. 5 α -Dihydrotestosterone enhances wound healing in diabetic rats. *Life Sci.* 2016; 152: 67-75.
29. Chodari L, Mohammadi M, Mohaddes G, Alipour MR, Ghorbanzade V, Dariushnejad H, et al. Testosterone and voluntary exercise, alone or together increase cardiac activation of AKT and ERK1/2 in diabetic rats. *Arq Bras Cardiol.* 2016; 107(6): 532-41.
30. Chodari L, Mohammadi M, Ghorbanzadeh V, Dariushnejad H, Mohaddes G. Testosterone and voluntary exercise promote angiogenesis in hearts of rats with diabetes by enhancing expression of VEGF-A and SDF-1a. *Can J Diabetes.* 2016; 40(5): 436-41.
31. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003; 83(3): 835-70.
32. Montico F, Hetzl AC, Cândido EM, Cagnon VH. Angiogenic and tissue remodeling factors in the prostate of elderly rats submitted to hormonal replacement. *Anat Rec (Hoboken).* 2013; 296(11): 1758-67.
33. Maggio M, Basaria S, Ble A, Lauretani F, Bandinelli S, Ceda GP, et al. Correlation between testosterone and the inflammatory marker soluble interleukin-6 receptor in older men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(1):345-7.
34. Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, Kapoor D, Channer KS, Jones TH. The effect of testosterone replacement on endogenous inflammatory cytokines and lipid profiles in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(7): 3313-8.

4.2 Publicação 2

Impacto do bloqueio dos receptores de andrógenos e estrógeno, e a inibição da enzima aromatase sobre o tecido de granulação*

Vinícius de Paiva Gonçalves¹, João Paulo Steffens², Carlos Rossa Junior¹, Luis C. Spolidorio³.

¹Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, SP, Brasil

²Departamento de Estomatologia, Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, PR, Brasil

³Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, SP, Brasil

Autor correspondente e endereço para correspondência: Luis Carlos Spolidorio, DDS, PhD. Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Rua. Humaitá, 1680 – Centro 14801-903, Araraquara – SP, Brasil. Tel: +55 (16) 3301-6479, Fax: +55 (16) 3301-6488 – lspolidorio@gmail.com

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca:
<http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaoatualizado.pdf>

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o impacto da administração de anastrozol, flutamida e fulvestranto, sobre o tecido de granulação utilizando-se clássico modelo de reparação tecidual experimental. Foram utilizados 50 ratos, divididos em 5 grupos experimentais: G1- Sem tratamento, G2- Anastrozol, G3- Flutamida, G4- Fulvestranto e G5-Durateston+Anastrozol. No dia 0 os animais foram submetidos ao tratamento farmacológico específico, e após 15 dias foi realizada ferida cutânea no dorso dos ratos. Após o período de 7 dias pós-cirúrgico, os animais foram eutanasiados para realização de biópsia excisional das feridas cutâneas e posterior processamento histopatológico. Foi avaliada a contração das feridas (H&E), análise estereométrica e qualitativa do tecido de granulação (H&E e Tricrômico de Masson) e mensuração da formação de colágeno (PicroSirius); e, ainda, foi realizada reação de imunohistoquímica para os anticorpos PCNA e KGF, e análise da expressão de VEGF, IL-6, TNF- α , TGF- β 1 e PDGF por ensaio multiplex. A flutamida, fulvestranto e anastrozol não produziram efeitos significativos sobre as estruturas constituintes do tecido de granulação. A flutamida aumentou a proliferação de fibroblastos (imunomarcados por PCNA) e expressão de KGF, e estimulou a contração das feridas ($p < 0.05$). A terapia com fulvestranto também aumentou a contração das feridas ($p < 0.05$). Ainda, a flutamida elevou a produção de TNF- α , TGF- β 1 e VEGF, e reduziu IL-6 e PDGF ($p < 0.05$), enquanto os demais tratamentos mantiveram baixos os níveis das citocinas e fatores de crescimento. Concluímos que drogas bloqueadoras dos receptores de andrógeno e estrógeno, como por exemplo a flutamida e fulvestranto, e inibidores da ação da aromatase, não alteraram o processo inflamatório envolvido no tecido de granulação, enquanto a flutamida acelerou a retração da ferida cutânea, não interferindo no processo inflamatório.

Palavras-chaves: Tecido de granulação. Androgênios. Inflamação. Ratos.

INTRODUÇÃO

O reparo de feridas corresponde a um processo dinâmico e altamente regulado por mecanismos celulares, humorais e moleculares, que se inicia diretamente após a lesão tecidual, podendo estender-se durante períodos prolongados, como descreve Reinke e Sorg¹. Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no processo de reparo de feridas são complexos, incluindo todas as fases da reação inflamatória, formação de tecido de granulação e remodelação tecidual. Após a injúria tecidual neutrófilos e macrófagos invadem a área da ferida destruindo partículas estranhas e, subsequentemente, células endoteliais promovem a formação de novos vasos sanguíneos que sustentam a formação de tecido de granulação, composto pela proliferação de fibroblastos que depositam matriz de colágeno e, posteriormente, há proliferação de queratinócitos que migram e promovem a reepitelização².

A desregulação de qualquer mecanismo celular e molecular pode comprometer a dinâmica dos eventos sequenciais do processo de reparo, retardando ou impedindo o processo de cura^{3, 4, 5}. Fatores locais ou sistêmicos alteram os componentes teciduais e moleculares do processo de reparo influenciando a cura de feridas^{3, 6}. Postula-se que alterações dos hormônios androgênicos circulantes, por exemplo a testosterona, influenciem o processo de reparo de feridas cutâneas^{2, 4, 7, 8}, destacando-se o uso de drogas bloqueadoras dos receptores de andrógeno e estrógeno, como por exemplo a flutamida e fulvestranto, e inibidores da ação da aromatase, enzima essa que converte a testosterona em estrógeno^{9, 10, 11}.

Há relatos na literatura que essas drogas produzem efeitos secundários indesejáveis, alguns comprometendo diretamente a sequência de eventos na resposta das células e dos tecidos envolvidos no processo de cura^{12, 13, 14}. Deve-se salientar que seus benefícios suplantam em muitos os efeitos indesejáveis e, estudos dose resposta devem ser considerados quanto a heterogeneidade interindividual na resposta direta ou indireta sobre células e tecidos durante o processo de cura.


Portanto, a proposição do presente trabalho foi avaliar o impacto da administração de anastrozol, flutamida e fulvestranto, sobre o tecido de granulação utilizando-se clássico modelo de reparação tecidual experimental.

MATERIAL E MÉTODO

Animais

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (Processo CEUA/FOAr #47/2014). Cinquenta ratos machos (*Rattus norvegicus* albinos, Holtzman), 3-4 meses de idade, foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos (n = 10/grupo), mantidos a uma temperatura de 23°C ±2, umidade de 65-75% e ciclo de luz controlado (12h luz-12h escuro), com ração e água disponível *ad libitum*. Os grupos e condições experimentais são demonstrados na Figura 1.

Figura 1- Representação da distribuição de ratos por grupo experimental.



GRUPOS	TRATAMENTO	INDUÇÃO DA FERIDA CUTÂNEA	EUTANÁSIA
G1 (n=10)	SEM TRATAMENTO	SIM	SIM
G2 (n=10)	ANASTROSOL	SIM	SIM
G3 (n=10)	FLUTAMIDA	SIM	SIM
G4 (n=10)	FULVESTRANTO	SIM	SIM
G5 (n=10)	DURATESTON+ANASTROSOL	SIM	SIM

Todos os tratamentos foram iniciados 15 dias antes da indução da ferida cirúrgica.
Fonte: Elaboração própria.

Animais sem tratamento

Os animais deste grupo foram submetidos apenas ao procedimento cirúrgico para indução de ferida cutânea, e não receberam tratamento farmacológico específico, representando, portanto, o grupo de animais com nível fisiológico de testosterona (Figura 1).

Inibição farmacológica de receptores de andrógeno, Inibição farmacológica de receptores de estrógeno e Inibição farmacológica da enzima aromatase

Respeitando os grupos experimentais, os animais foram tratados com um dos protocolos a seguir: i - 50 mg/kg de peso corporal flutamida (F9397, Sigma-Aldrich) via gavagem oral, a cada 02 dias¹⁵, com o propósito de bloquear a ação da testosterona; ii - 1,5 mg/kg de peso corporal/dia de fulvestranto (I4409, Sigma-Aldrich), via subcutânea¹⁶, com o propósito de bloquear a ação do estrógeno e permitir ação apenas da testosterona; iii - 0,2 mg/kg de peso corporal/dia de anastrozol (A273, Sigma-Aldrich) via gavagem oral¹⁷, com o propósito de bloquear a conversão de testosterona em estrógeno e, dessa forma, permitir apenas a ação da testosterona (Figura 1).

Tratamento com testosterona (durateston)

Foi realizada semanalmente a administração de 250 mg/kg de Durateston (Schering-Plough) diluído em 0,1 ml de óleo de milho por via intramuscular¹⁸. O tratamento foi realizado até o final do período experimental (Figura 1). O tratamento foi realizado com o propósito de promover nível suprafisiológico de testosterona nos animais.

Análise do nível sérico de testosterona e Peso dos animais

Amostras de sangue caudal foram coletadas de cada animal no dia 0 (baseline), anterior à administração das drogas. No dia do sacrifício foram coletadas amostras de sangue de cada animal, por punção cardíaca, para avaliação da concentração hormonal final. O nível sérico de testosterona foi avaliado utilizando-se imunoensaio de quimioluminescência (Immulite 2000,

Siemens Healthcare Diagnostics, Gwynedd, Reino Unido) no Laboratório de Análises Clínicas São Lucas/Araraquara-SP.

O peso dos animais também foi registrado no momento da eutanásia (dia 21) e avaliado comparativamente ao peso obtido no dia 0.

Indução da ferida cutânea

Após 15 dias do início dos tratamentos, os animais foram submetidos a anestesia com ketamina (1 mL/kg) e xilazina (0,4 mL/kg) para realização de procedimento cirúrgico para indução de ferida cutânea na região dorsal, localizada na linha média². O animal foi colocado em decúbito esternal e após tricotomia, a antisepsia da região dorsal foi realizada com 2% de digluconato de clorexidina. Para a ressecção circular da pele, no centro da área depilada, as incisões foram feitas por rotação da borda cortante do punch metálico, medindo 0,6cm de diâmetro, até a exposição da fáscia muscular dorsal. As lesões permaneceram abertas, não recebendo nenhum tratamento oclusivo para que não interferisse na cicatrização, e a hemostasia foi realizada por compressão digital usando gaze estéril. Os ratos receberam acetaminofeno (300 mg/kg/peso corporal, via oral) para alívio da dor pós-operatória e uma combinação de sais de benzilpenicilina e estreptomicina (Pentabiótico/0,2 ml/rato, via intramuscular). Após 7 dias de indução da ferida cirúrgica (dia 21), os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico e os tecidos coletados para análise.

Eutanásia e coleta das amostras

Após o período experimental, todos os ratos foram eutanasiados por aprofundamento anestésico e as amostras das feridas coletadas e divididas ao meio. Metade foi fixada em solução de paraformaldeído a 4% durante 48 horas. Após a fixação, as peças foram lavadas em água corrente, desidratadas em série crescente de álcoois e diafanizadas em xilol. Após a diafanização, as peças foram incluídas em parafina, de forma padronizada para obtenção de cortes histológicos semi-seriados de 5 µm que foram corados com hematoxilina e eosina,

tricroômico de masson e picrosirius red. A outra metade foi congelada a -80° para análise do perfil de citocinas inflamatórias através do imunoenensaio multiplex.

Análise estereométrica

As imagens dos cortes microscópicos corados em H&E foram capturadas utilizando-se câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio de luz comumente transmitida e objetiva de 40x (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemanha). Uma grade de $32.400 \mu\text{m}^2$ com 9×4 quadrados de $30 \mu\text{m}$ foi construída usando um software/editor de imagem (Adobe Photoshop CS5) e sobreposto nas imagens digitais obtidas dos cortes histológicos. As avaliações foram realizadas na região de transição de ferida/tecido normal, em lados opostos, considerando-se as duas bordas da ferida, além de um campo central da mesma. Um único examinador, previamente treinado e calibrado, realizou a análise estereométrica através da técnica de contagem de pontos. Foram feitas a determinação da densidade volumétrica (%) de células inflamatórias, fibroblastos (identificados como células fusiformes ou estreladas, núcleo ovóide ou alongado), matriz extracelular, figuras vasculares, e em cada grupo, a partir dos valores obtidos das medidas de cada animal foram estabelecidos as médias e os desvios padrão. A avaliação foi complementada pela análise qualitativa através dos cortes corados por Tricroômico de Masson.

Mensuração do colágeno birrefringente (Picrosirius Red)

A densidade volumétrica (%) de colágeno nas regiões de borda e centro da ferida foi estimada a partir de cortes corados com solução a 0,1% de PicroSirius Red (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA). Os cortes foram analisados com filtros de polarização acoplados ao microscópio de luz (BX-51, Olympus, Tóquio, Japão). Foi utilizado 1 corte de cada animal, e 1 imagem foi capturada de cada uma das três regiões da ferida, como descrito anteriormente, com o auxílio de uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) e objetiva de 20x. Todas

as imagens foram capturadas com parâmetros padronizados de intensidade de luz, abertura do diafragma do condensador, altura do condensador, objetiva, angulação do polarizador e brilho da imagem. A quantidade de colágeno foi estimada utilizando-se metodologia previamente descrita na literatura¹⁹, através do processador de imagens ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), em que as cores proporcionadas pela birrefringência das imagens são isoladas utilizando-se o histograma de matiz disponível na guia “Color Threshold”. As imagens foram convertidas para preto e branco, de modo que cada pixel não preto se tornou branco e cada pixel preto permaneceu preto. Em seguida, a porcentagem ocupada por cada cor foi calculada a partir do número de pixels em cada faixa de matiz. Para esta mensuração, manipulou-se o histograma de matiz para selecionar cada comprimento de onda, ou seja, vermelho/alaranjado (matizes 2 a 38 e 230 a 256), amarelo (matiz 39 a 51) e verde (matiz 52 a 128). O número de pixels de cada frequência de cor foi expresso como porcentagem do total de colágeno birrefringente daquele comprimento de onda no total da imagem.

Análise da contração das feridas

Foi realizada a mensuração linear dos cortes histológicos das feridas cutâneas, com o objetivo de avaliar a contração das lesões. Os cortes histológicos corados com H&E foram fotografados usando microscópio de luz comumente transmitida e objetiva de 4x (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemanha) e, em seguida, foi realizada análise utilizando-se o software Imagem J. Foi traçada uma linha entre as bordas das feridas e, automaticamente, o software gerou a medida em micrômetros, e em cada grupo, a partir dos valores obtidos de cada mensuração por animal foram estabelecidos as médias e desvios padrão.

Imunohistoquímica

A imunomarcção do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e do fator de crescimento de queratinócitos (KGF) foram avaliadas por imunohistoquímica. O protocolo, previamente padronizado, foi estabelecido para cada anticorpo: PCNA (1:50 - Invitrogen

133900) e KGF (1:25-ab131162-Abcam). As proteínas alvo foram detectadas utilizando-se o sistema DAB-estreptavidina (LSAB-2, Dako Cytomation) e, em seguida, os cortes foram corados com hematoxilina e as lamínulas montadas com Permount. As imagens foram capturadas através de câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada em um microscópio de luz comumente transmitida e objetiva de 40x (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemanha). A quantificação de células imunomarcadas (fibroblastos) foi realizada no tecido conjuntivo próximo as bordas da ferida e na área central para o anticorpo de PCNA, enquanto que para a quantificação de queratinócitos expressando o anticorpo KGF, apenas o epitélio das bordas da ferida foi considerado. Para a determinação do número de células em proliferação, foram consideradas aquelas com marcação positiva (marcação marrom) dentro dos campos selecionados.

Expressão de citocinas inflamatórias locais (MULTIPLEX)

A concentração tecidual de VEGF, IL-6, TNF- α , TGF- β 1 e PDGF foi avaliada por ensaio multiplex (Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho - LACTAD/UNICAMP - Campinas/SP). As amostras de proteínas totais foram extraídas com RIPA Lysis Buffer reagente, 10x (Merck, Millipore) e quantificadas pelo método BCA Protein Assay (Novagen, EMD Chemicals), de acordo com as instruções do fabricante. Para o ensaio multiplex, utilizou-se o Milliplex Kit (EMD Millipore), que fornece análise de diferentes analitos em um mesmo poço da placa, e o ensaio completo foi realizado de acordo com os protocolos de cada kit e as instruções do fabricante. Os resultados do ensaio foram normalizados dividindo-se pelos respectivos valores de proteína alvo obtidos na quantificação pelo método de ensaio de proteína BCA. Os dados gráficos foram expressos em fold-change.

Análise dos dados

Os dados foram submetidos aos testes de homogeneidade e distribuição usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, one-way ANOVA e o pós-teste de Tukey foram realizados

para análise comparativa entre os grupos, e o teste t para comparar o nível de testosterona final e baseline, assim como para realizar a análise comparativa do peso dos animais. Todas as análises foram realizadas usando o software de análises estatísticas GraphPad Prism 6. Todos os testes foram aplicados com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

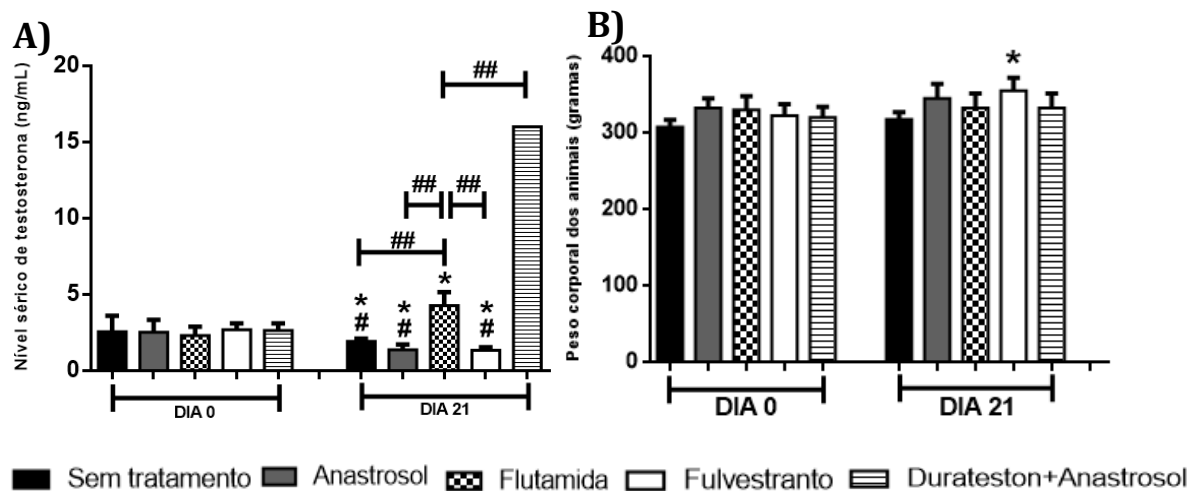
RESULTADOS

Nível sérico de testosterona

Os valores de testosterona circulante foram similares entre todos os grupos no dia 0 ($p > 0,05$). No dia 21, o nível sérico do hormônio foi similar entre os grupos controle, ANA e FULV ($p > 0,05$), diferindo-se significativamente dos grupos tratados com flutamida (FLUTA) e durateston+anastrozol (DURA+ANA), que apresentaram altos níveis de testosterona ($p < 0,05$). Ainda, comparando-se os grupos FLUTA e DURA+ANA, nesse último o nível hormonal foi acentuadamente superior ao FLUTA ($p < 0,05$) (Figura 2A).

A média do peso corporal dos animais manteve-se uniforme entre todos os grupos, havendo aumento significativo apenas no grupo fulvestranto analisando-se comparativamente no dia 0 e 21 (Figura 2B).

Figura 2 – Médias do nível sérico de testosterona e peso corporal dos animais.



A) Médias do nível sérico de testosterona circulante (ng/mL) e B) Médias do peso corporal dos animais, no período inicial (dia 0) e 21 dias após o bloqueio dos receptores de andrógenos e estrógeno, e da enzima aromatase. * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo no dia 0, # $p < 0,05$ comparado ao grupo durateston+anastrozol no dia 21, ## $p < 0,05$ em relação ao grupo flutamida no dia 21. Média (\pm DP).

Fonte: Elaboração própria.

O bloqueio dos receptores de andrógenos e estrógeno, e a inibição da aromatase não produziram efeitos significativos sobre os componentes do tecido de granulação

O conteúdo do leito da ferida estava constituído totalmente por tecido de granulação, com predomínio de células inflamatórias e em menor porcentagem, matriz extracelular, fibroblastos e vasos sanguíneos, como confirmado pela mensuração estereométrica. Independente do tratamento, em todos os grupos a porcentagem de células inflamatórias foi similar, com discreto aumento no grupo tratado com flutamida (FLUTA) ($p>0.05$). Por outro lado, o conteúdo de matriz extracelular no grupo tratado com flutamida apresentou-se reduzido em relação aos demais grupos ($p>0.05$), diferindo-se estatisticamente apenas do grupo DURA+ANA ($p<0.05$). A terapia hormonal seguida da administração de anastrozol (DURA+ANA) também promoveu elevada formação de matriz extracelular comparando-se aos grupos sem tratamento, ANA ($p<0.05$) e FULV ($p>0.05$). A densidade volumétrica de fibroblastos foi aumentada pelo tratamento com anastrozol, flutamida e fulvestranto, em relação aos grupos sem tratamento e DURA+ANA ($p<0.05$). Similarmente, a densidade volumétrica de vasos sanguíneos diminuiu no grupo DURA+ANA quando comparado grupo FULV ($p<0.05$) (Figuras 3 e 4).

A análise qualitativa por Tricrômico de Masson confirmou as observações da avaliação estereométrica. Houve padrão semelhante de formação do tecido entre todos os grupos experimentais, com elevada deposição de fibras colágenas no grupo DURA+ANA comparando-se ao verificado nos demais grupos (Figura 5).

Figura 3 - Médias da análise estereométrica de células inflamatórias, fibroblastos, matriz extracelular e figuras vasculares do tecido de granulação (% \pm desvio padrão). [Continua]

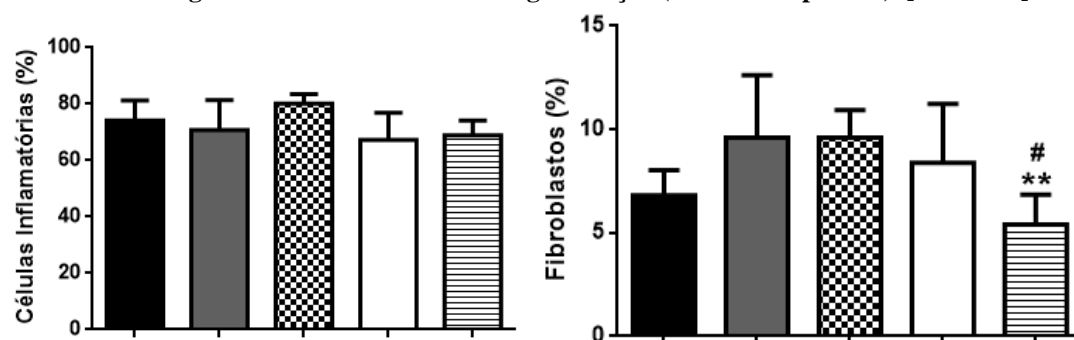
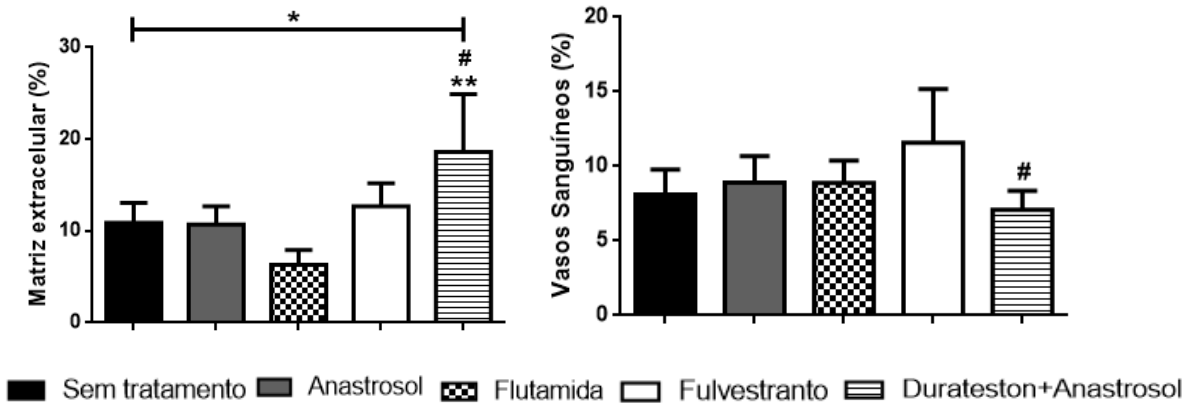


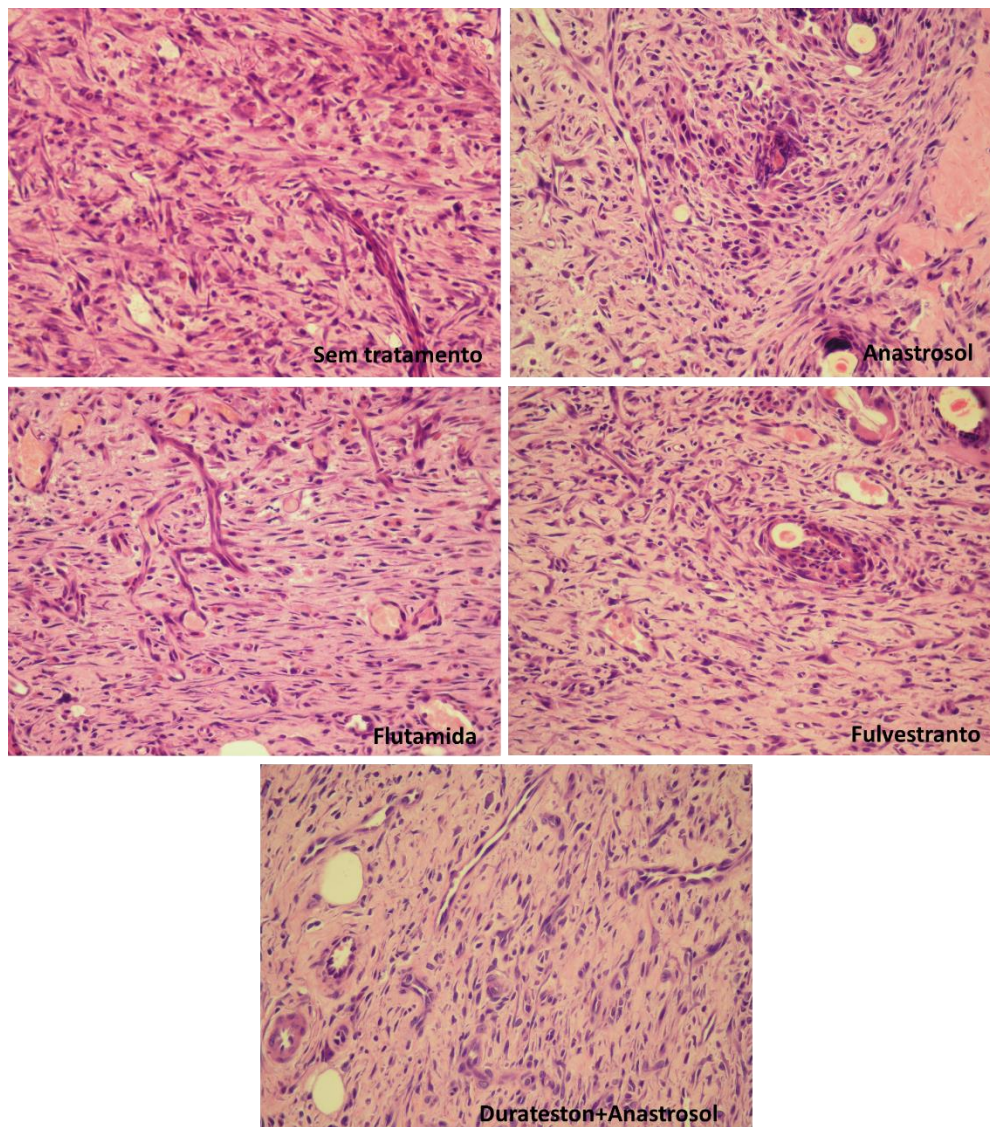
Figura 3 - Médias da análise estereométrica de células inflamatórias, fibroblastos, matriz extracelular e figuras vasculares do tecido de granulação (% \pm desvio padrão). [Conclusão]



Os valores indicam aumento na deposição de matriz extracelular pelo tratamento de durateston+anastrozol. * $p < 0.05$ em relação ao grupo sem tratamento, ** $p < 0.05$ em relação ao grupo flutamida, # $p < 0.05$ em relação ao grupo fulvestranto. Média (\pm DP).

Fonte: Elaboração própria.

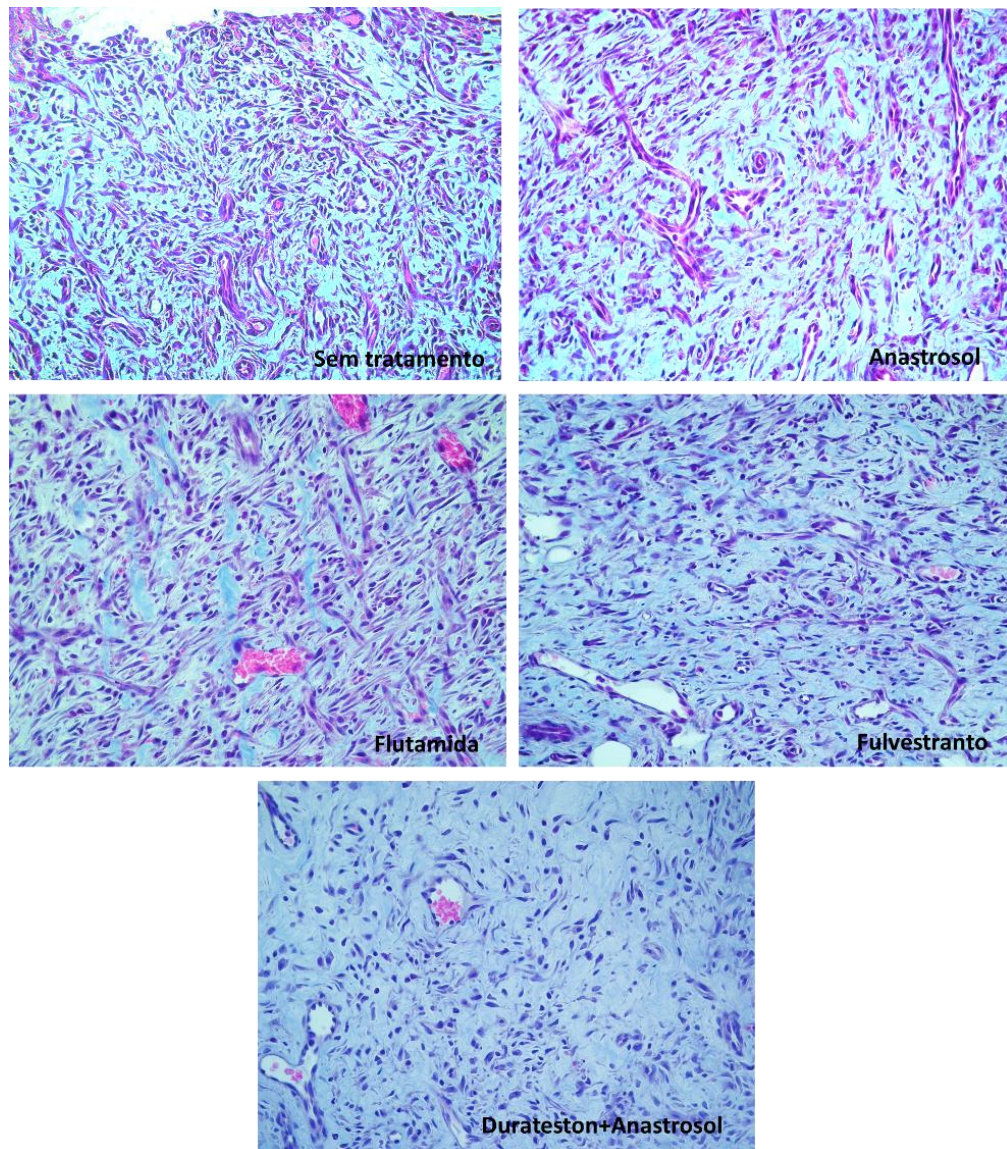
Figura 4 - Fotomicrografias representativas da análise estereométrica referente aos grupos sem tratamento, anastrozol, futamida, fulvestranto e durateston+anastrozol. Coloração H&E (40x).



Pode-se observar formação de clássico tecido de granulação composto por células inflamatórias, fibroblastos, matriz extracelular e vasos sanguíneos.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 5 - Fotomicrografias representativas dos grupos sem tratamento, anastrozol, flutamida, fulvestranto e durateston+anastrozol. Coloração Tricrômico de Masson (40x).



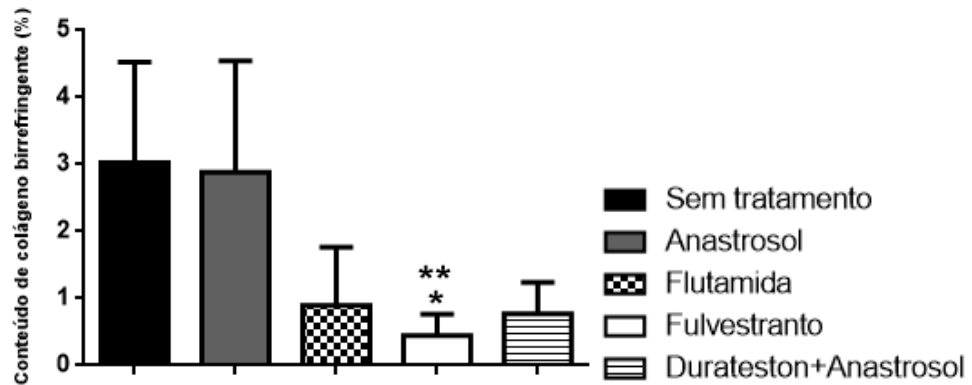
Pode-se observar formação de clássico tecido de granulação composto por células inflamatórias, fibroblastos, matriz extracelular e vasos sanguíneos. A marcação em azul evidencia a formação de fibras constituintes da matriz extracelular.

Fonte: Elaboração própria.

Os diferentes tratamentos não modularam a deposição de colágeno no tecido de granulação

A presença de colágeno apresentou-se caracteristicamente por escassos e finos feixes de fibras, distribuídos no centro e região de bordas da ferida. Observou-se menor porcentagem de feixes de fibras de colágeno no tecido de granulação dos animais tratados com fulvestranto quando comparado aos grupos sem tratamento e anastrozol ($p < 0.05$) (Figuras 6 e 7).

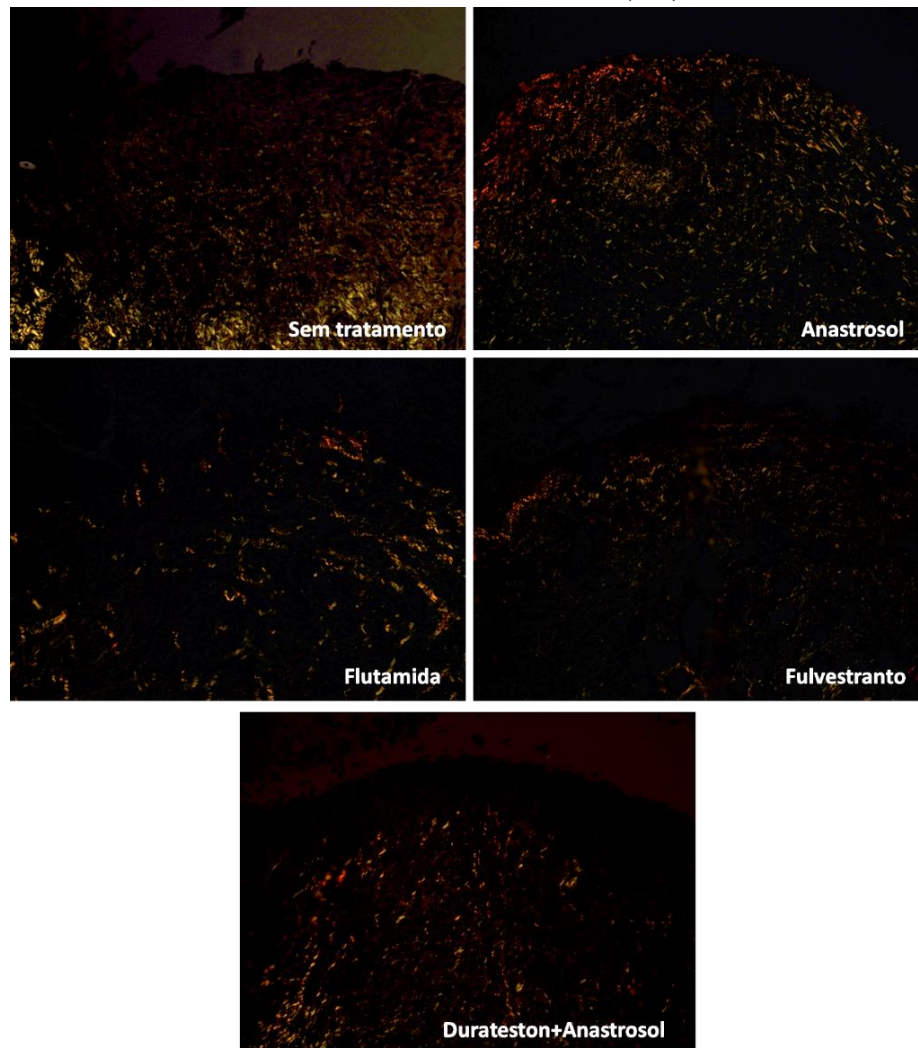
Figura 6 - Análise quantitativa de colágeno birrefringente nos cortes corados com PicroSirius Red.



Média e desvio-padrão das porcentagens de feixes de fibras colágenas, no tecido de granulação, referentes às regiões de borda e centro das lesões. * $p < 0.05$ comparado ao grupo sem tratamento, ** $p < 0.05$ comparado ao grupo anastrosol. Média (\pm DP).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 7 - Fotomicrografias representativas da análise quantitativa de feixes de fibras colágenas referente aos grupos sem tratamento, anastrosol, flutamida, fulvestranto e durateston+anastrosol. Picrosirius Red (20x).



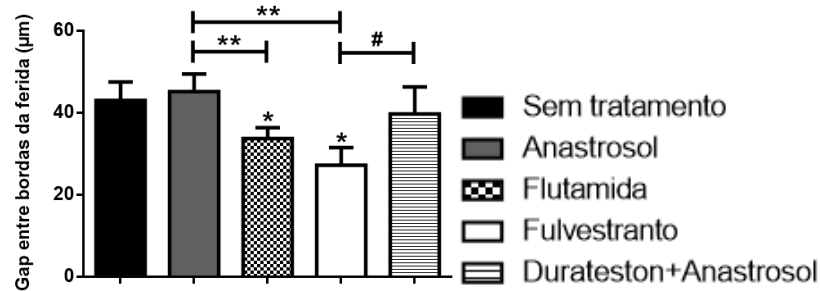
Os cortes foram analisados em microscópio com luz polarizada. Pode-se observar, em todos os grupos, fibras colágenas delgadas e em escassa quantidade.

Fonte: Elaboração própria.

Contração da ferida é aumentada com bloqueio dos receptores de andrógenos e estrógeno

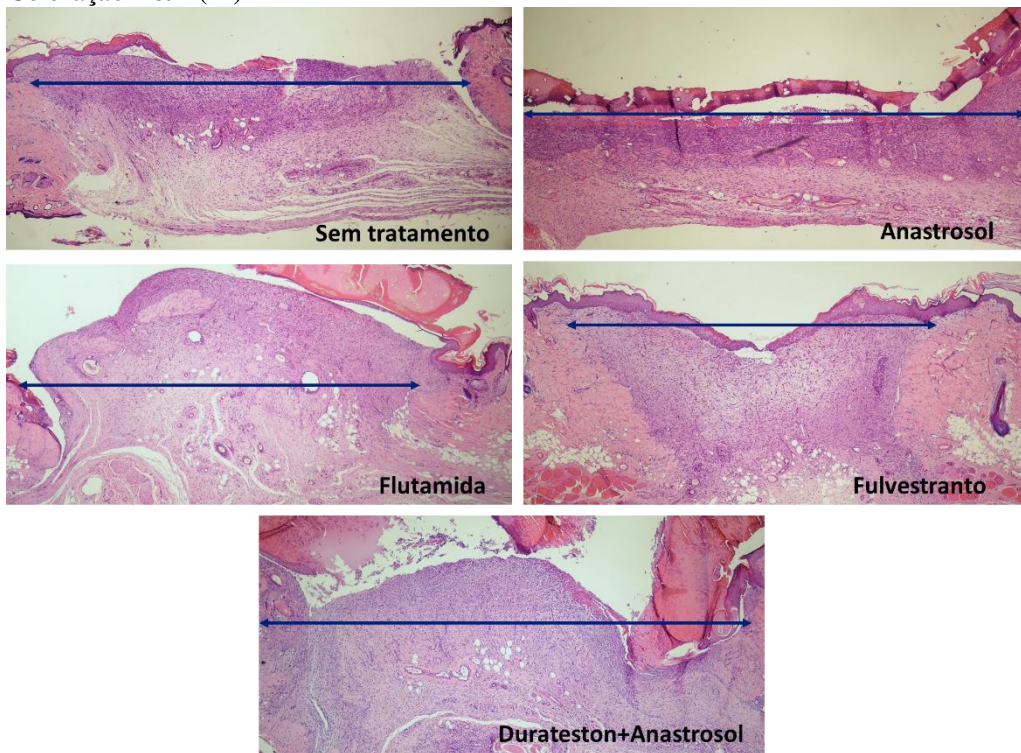
O bloqueio dos receptores de andrógenos e estrógeno, pelo tratamento com flutamida e fulvestranto, respectivamente, promoveu significativa contração das bordas das feridas comparando-se a todos os grupos ($p < 0.05$) (Figuras 8 e 9).

Figura 8 – Análise da contração das bordas das feridas.



Média e desvio-padrão da análise do gap entre as bordas das feridas, representando gaps maiores a uma menor contração da ferida. * $p < 0.05$ comparado ao grupo sem tratamento, ** $p < 0.05$ comparado ao grupo anastrosol, # $p < 0.05$ comparado ao grupo durateston+anastrosol. Média (\pm DP).
Fonte: Elaboração própria.

Figura 9 - Fotomicrografias representativas das feridas cutâneas dos ratos referentes aos grupos sem tratamento, anastrosol, flutamida, fulvestranto e durateston+anastrosol. Coloração H&E (4x)



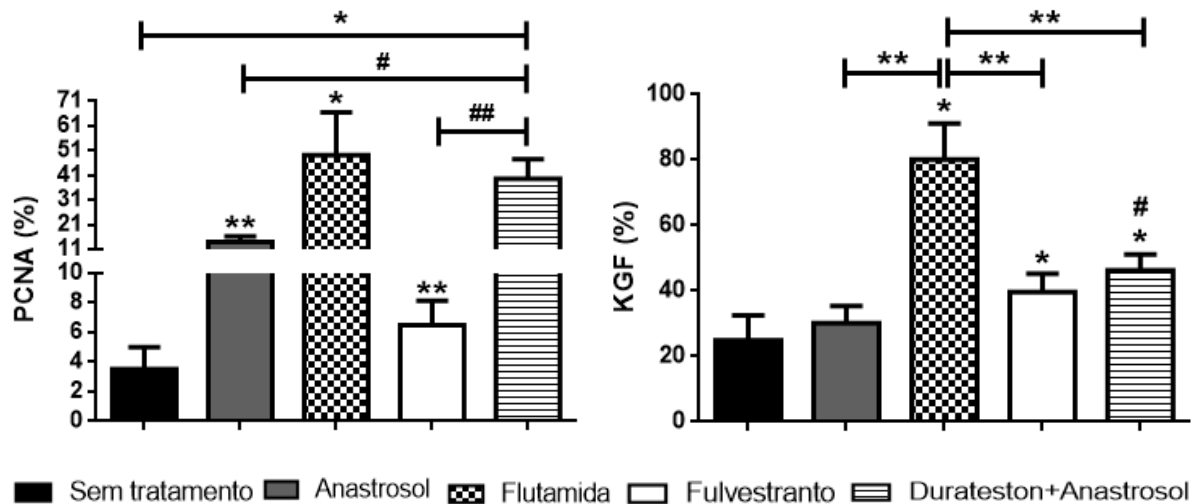
As linhas em azul demonstram o gap entre as bordas. Pode-se observar menor gap entre as bordas da ferida nos grupos flutamida e fulvestranto.

Fonte: Elaboração própria.

A inibição da ação de andrógenos pela flutamida eleva a produção de fibroblastos e marcação de KGF favorecendo o reparo cutâneo e reepitelização

A imunomarcagem de **PCNA** foi aumentada por todos os tratamentos, comparando-se ao grupo sem tratamento. No entanto, a proliferação de fibroblastos foi mais elevada nos grupos tratados com flutamida e testosterona+anastrozol, que apresentaram porcentagem de células imunomarcadas para o anticorpo PCNA, acentuadamente maior em relação ao grupo sem tratamento e demais grupos ($p < 0.05$). De maneira semelhante, a marcação do fator de crescimento em queratinócitos (**KGF**) foi maior em todos os grupos, comparativamente ao sem tratamento. O tratamento com flutamida promoveu acentuado e significativo aumento da imunomarcagem de KGF, em relação a todos os grupos ($p < 0.05$), enquanto o tratamento com durateston seguido da administração de anastrozol aumentou a expressão do anticorpo comparado a terapia com anastrozol apenas ($p < 0.05$) (Figuras 10, 11 e 12).

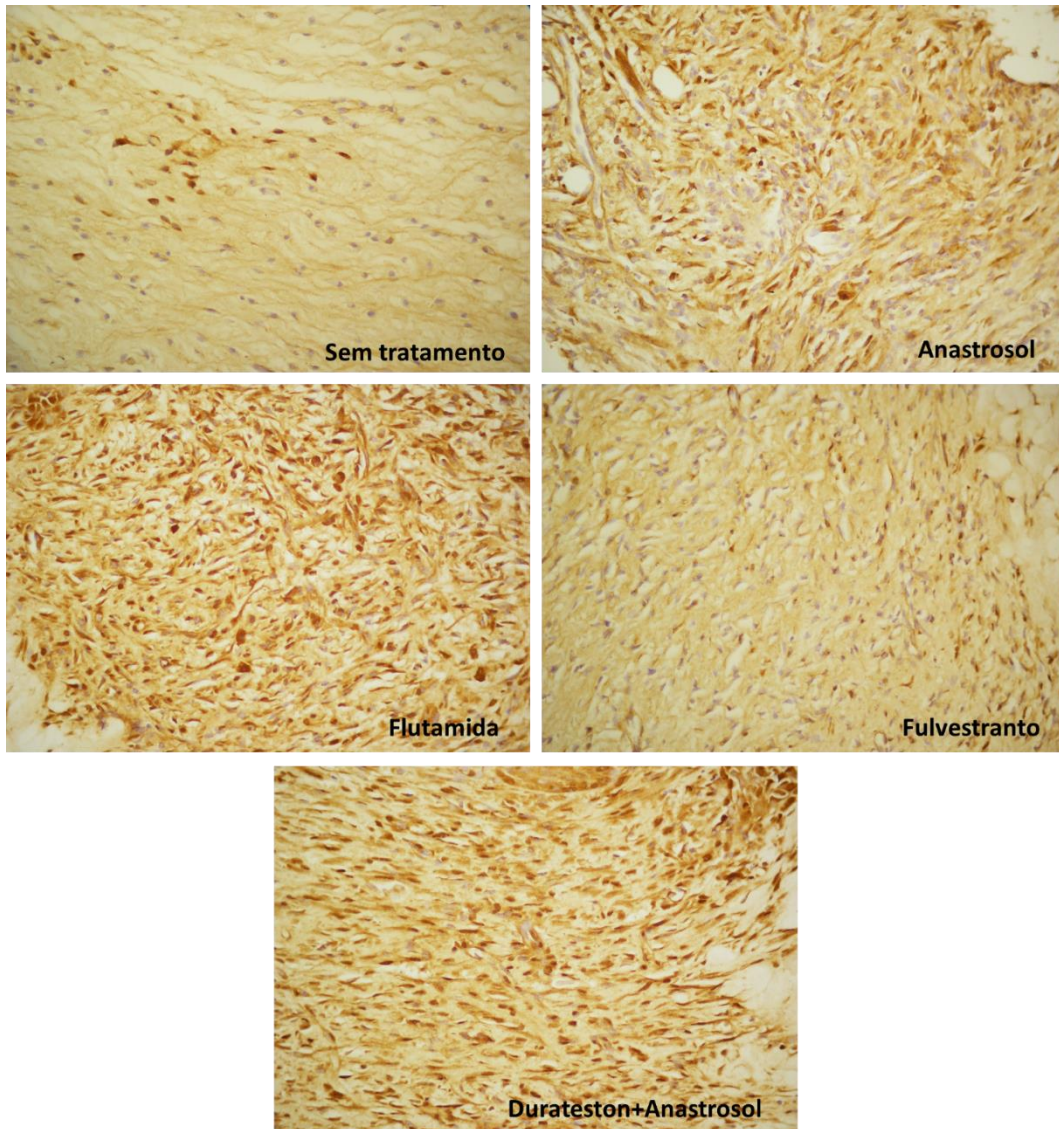
Figura 10 – Médias da expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e fator de crescimento em queratinócitos KGF (% \pm desvio padrão) no tecido de granulação dos grupos de ratos sem tratamento, tratados com anastrozol, flutamida, fulvestranto e durateston+anastrozol.



* $p < 0.05$ em relação ao grupo sem tratamento, ** $p < 0.05$ em relação ao grupo flutamida, # $p < 0.05$ comparado ao grupo anastrozol, ## $p < 0.05$ comparado ao grupo fulvestranto. Média (\pm DP).

Fonte: Elaboração própria.

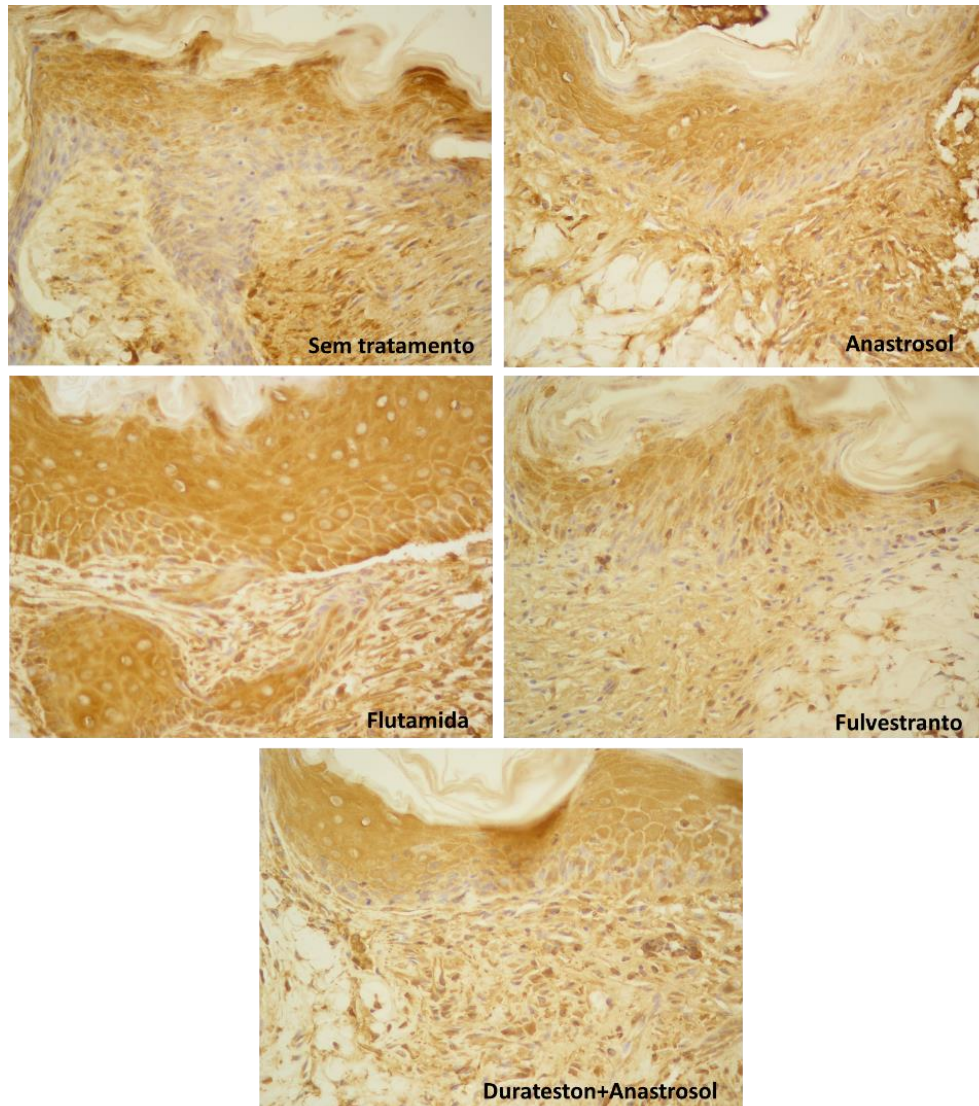
Figura 11 – Fotomicrografias de cortes histológicos corados por imunohistoquímica (40x).



Fotomicrografias representativas da reação de imunohistoquímica para o anticorpo PCNA, referentes aos grupos sem tratamento, anastrozol, flutamida, fulvestranto e durateston+anastrozol. Foram quantificados os fibroblastos imunomarcados em marrom distribuídos no tecido de granulação.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 12 – Fotomicrografias de cortes histológicos corados por imunohistoquímica (40x).



Fotomicrografias representativas da reação de imunohistoquímica para o anticorpo KGF, referentes aos grupos sem tratamento, anastrozol, flutamida, fulvestranto e durateston+anastrozol. Foram quantificadas as células imunomarcadas em marrom, distribuídas no tecido epitelial das bordas da ferida.

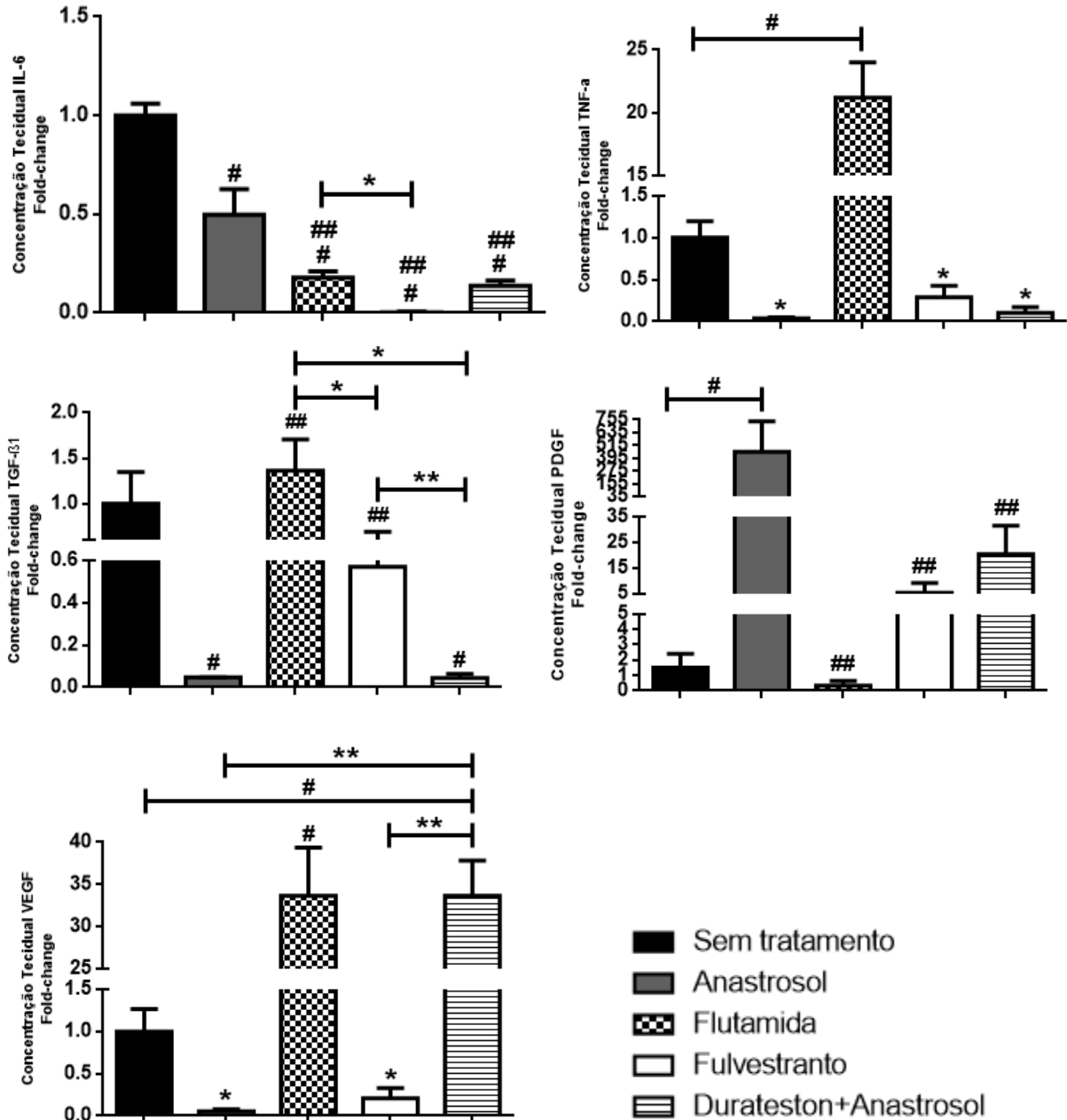
Fonte: Elaboração própria.

Bloqueio de receptores de andrógenos está associado ao aumento da resposta imunoinflamatória

O tratamento com anastrozol reduziu acentuadamente a concentração tecidual de VEGF, IL6, TNF- α e TGF- β 1, e elevou de maneira significativa a expressão de PDGF ($p < 0.05$). O bloqueio de receptores de andrógenos pela flutamida promoveu aumento de VEGF, TNF- α e TGF- β 1, e diminuiu os níveis de PDGF e IL-6 ($p < 0.05$). O bloqueio de receptores de estrógeno pelo

fulvestranto aumentou a expressão de PDGF e manteve reduzida a expressão das demais citocinas inflamatórias ($p < 0.05$). A administração concomitante de durateston e anastrozol elevou significativamente a expressão de VEGF e PDGF, e diminuiu a concentração de TNF- α , TGF- β 1 e IL-6 (Figura 13).

Figura 13 - Fold-change da concentração tecidual de citocinas inflamatórias.



* $p < 0.05$ comparado ao grupo flutamida, ** $p < 0.05$ comparado ao grupo durateston+anastrozol, # $p < 0.05$ em relação ao grupo sem tratamento, ## $p < 0.05$ em relação ao grupo anastrozol.

Fonte: Elaboração própria.

DISCUSSÃO

Uma possível correlação entre o impacto da inativação de receptores de andrógenos e estrógeno, e inibição da conversão de testosterona em estrógeno, vem sendo estudada em alguns protocolos experimentais e descrição clínica, de modo a facilitar a etiopatologia de afecções crônicas como, por exemplo, a reparação cutânea^{4, 20, 21, 22}. Entretanto, não se sabe ao certo, até que ponto as alterações hormonais influenciam na formação do tecido de granulação e consequentemente cura de feridas. O modelo de indução de feridas cirúrgicas no dorso de ratos há bastante tempo vem sendo empregado. Sua escolha deve-se ao baixo custo, à facilidade de manipulação e, principalmente, às semelhanças biológicas com o tecido de granulação humano^{2, 23, 24, 25}. Há algumas evidências da participação hormonal sobre a homeostase do tecido de granulação^{7, 4, 8}. Há relatos na literatura pertinente que mostram o impacto dos hormônios sexuais masculinos sobre a resposta inflamatória, revascularização, deposição de matriz extracelular e reepitelização, associados ao reparo^{2, 4, 7, 8, 20, 22}. Ashcroft e Mills⁷ verificaram que receptores de andrógenos são expressos em queratinócitos, células inflamatórias (principalmente macrófagos) e fibroblastos presentes no processo de reparo experimental²⁶, reforçando a sugestão de que os andrógenos podem interferir no reparo através desses receptores. No presente trabalho estudamos pela primeira vez o impacto do uso de drogas bloqueadoras dos receptores de andrógeno e estrógeno, como por exemplo a flutamida e fulvestranto, e inibidores da ação da aromatase (enzima essa que converte a testosterona em estrógeno), sobre o tecido de granulação. Os protocolos farmacológicos para bloqueio dos receptores de andrógeno (flutamida), estrógeno (fulvestranto) e inibição da enzima aromatase (anastrozol), foram efetivos, como observado pela análise do nível sérico de testosterona. O emprego do anastrozol, associado ou não a administração de durateston, e a administração do fulvestranto foi estabelecido, respectivamente, com o propósito de inibir a conversão da testosterona em estrógeno e bloquear os receptores de estrógeno. Contudo, não foi objetivo do

trabalho analisar os efeitos do estrógeno no modelo de reparo cutâneo, e sim permitir a avaliação isolada da testosterona sobre esse processo. Por outro lado, o bloqueio dos receptores de andrógenos pela flutamida inibe sua ativação pela testosterona e, conseqüentemente, permite eliminar a ação do hormônio no organismo. O aumento no nível sérico de testosterona verificado nos animais tratados com flutamida confirma, portanto, a ausência de atividade do hormônio sobre as células e tecidos, indicando um mecanismo de feedback, devido a inativação dos receptores de andrógenos, como sugerido por Steffens et al.²¹. As doses de flutamida, fulvestranto, anastrozol e durateston, utilizadas no presente trabalho, foram baseadas em trabalhos anteriores, os quais demonstraram que a concentração sérica dessas drogas, mostrara-se bem toleradas e, farmacologicamente ativas em tratamentos em ratos^{15, 16, 17, 18}.

O bloqueio dos receptores de andrógenos e estrógeno, e a inibição da enzima aromatase não alteraram a porcentagem de infiltrado inflamatório e fibroblastos, bem como a deposição de matriz extracelular e angiogênese, no tecido de granulação no período analisado. Considerando-se o período experimental, idade dos ratos e dosagem das drogas, podemos especular que o bloqueio dos receptores de andrógenos e estrógeno, e a inibição da enzima aromatase não alteraram a porcentagem de infiltrado inflamatório e fibroblastos, pois os valores da porcentagem dos componentes celulares e não celulares do tecido de granulação foram lineares entre todos os grupos mostrando-se que não foram sensíveis aos tratamentos estabelecidos. Os resultados do presente trabalho diferem dos achados de Torres-Chávez et al.¹² que relatam que a flutamida é capaz de bloquear o efeito anti-inflamatório da testosterona, quando avaliados na presença de inflamação temporo-mandibular, logicamente, nesse caso deve-se levar em consideração o protocolo utilizado. Portanto, torna-se necessária a avaliação do nível sérico do estradiol para avaliar sua possível atividade, o que não foi realizado nesse trabalho. Complementar à avaliação estereométrica feita nos tecidos corados com H&E, foi realizada coloração de Picrosirius para quantificação da porcentagem de feixes de fibras de

colágeno, que confirmou os achados histopatológicos. Contrário aos nossos achados, há algumas evidências da participação da flutamida e fulvestranto na redução de feixes de fibras de colágeno^{13, 14}, e nesse sentido sugere-se que a ação da testosterona dependa do efeito sinérgico do estrógeno.

Interessante notar que, apesar da linearidade dos valores da porcentagem dos feixes de fibras de colágenos observou-se significativo aumento da atividade proliferativa de fibroblastos. A proliferação de fibroblastos foi induzida pela inativação dos receptores de andrógenos (flutamida) tal como os resultados encontrados por Wang et al.²² que observaram, *in vitro*, aumento na taxa de proliferação e migração de fibroblastos Knockout para receptores de andrógenos. No presente trabalho não foram utilizados animais Knockout para receptores de andrógenos. Tal fato nos leva a especular que períodos experimentais mais longos poderiam mostrar eventuais modificações na quantificação dos componentes colagenosos em ratos tratados com essa droga. Entretanto, apesar da morfologia do tecido de granulação estar aparentemente normal e não sofrer impacto do uso de drogas bloqueadoras dos receptores de andrógeno e estrógeno e inibidores da ação da aromatase, observamos sensibilização das células na secreção dos seus produtos biologicamente ativos. Nesse ponto vale destacar que a concentração dos mediadores químicos pró inflamatórios e fatores de crescimento analisados no presente trabalho, que são conhecidamente pleiotrópicos, sofreram significativo impacto dos medicamentos administrados. Portanto, uma questão fundamental que surge deste trabalho está concentrada nos mecanismos envolvidos no funcionamento das células que compõe o tecido de granulação. Nesse caso, períodos posteriores ao estudado poderiam elucidar melhor os eventuais impactos das oscilações de testosterona circulante. Tal como detectado no presente trabalho, Steffens et al.²¹ também relataram a redução da expressão de IL-6 pela flutamida na reparação da gengivite experimental. IL-6 possui propriedades biológicas como supressão da produção de TNF- α e, regulação da resposta inflamatória. Dessa maneira, a tendência do

tratamento com flutamida em aumentar o infiltrado inflamatório e diminuir a deposição de matriz extracelular do tecido de granulação verificada em nosso trabalho, pode estar relacionada ao aumento no nível de TNF- α devido a significativa redução na expressão de IL-6. Por outro lado, a administração de flutamida proporcionou maior contração da ferida, como também observado pelo tratamento com fulvestranto. A contração da ferida por ambos tratamentos pode ser decorrente da expressão de TGF- β 1, que é responsável pela transformação de fibroblastos em miofibroblastos²⁷. Concomitante a esses eventos, o bloqueio dos receptores de andrógenos, pela flutamida, estimulou significativamente a expressão do fator de crescimento em queratinócitos (KGF), sugerindo potencial ação estimuladora da reepitelização. Comparando-se a esse resultado, Gilliver et al.²⁸ relatam que em ratos submetidos ao bloqueio da ação de dihidrotestosterona a reepitelização é acelerada, enquanto in vitro a presença do hormônio retarda a migração de queratinócitos. Esses dados sinalizam o impacto positivo do bloqueio da ação dos andrógenos em estimular a reepitelização e, considerando-se que a oclusão da ferida decorre do processo paralelo de reepitelização e contração (Gilliver et al.²⁸), nossos dados referentes à contração das feridas e a expressão de KGF suportam a ideia que a flutamida acelera a retração da ferida cutânea, não interferindo no processo inflamatório.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados aqui expostos podemos concluir que:

- Drogas bloqueadoras dos receptores de andrógeno (flutamida) e estrógeno (fulvestranto), e inibidores da ação da aromatase (anastrozol) não alteraram o processo inflamatório envolvido no tecido de granulação.
- Flutamida e fulvestranto aceleraram a retração da ferida cutânea.

REFERÊNCIAS

1. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. Eur Surg Res. 2012; 49(1): 35–43.

2. Romana-Souza B, Assis de Brito TL, Pereira GR, Monte-Alto-Costa A. Gonadal hormones differently modulate cutaneous wound healing of chronical stressed mice. *Brain Behav Immun*. 2014; (36): 101-10.
3. Robson MC, Steed DL, Franz MG. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg*. 2001; 38(2): 72–140.
4. Gilliver SC, Ashworth JJ, Mills SJ, Hardman MJ, Ashcroft GS. Androgens modulate the inflammatory response during acute wound healing. *J Cell Sci*. 2006; 119(Pt 4): 722-32.
5. Brasileiro Filho G. *Bogliolo patologia geral*. 5ed. edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.
6. Kumar V, Abbas AK., Aster JC. *Robbins patologia básica*. 9ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.
7. Ashcroft GS, Mills SJ. Androgen receptor-mediated inhibition of cutaneous wound healing. *J Clin Invest*. 2002; 110(5): 615-24.
8. Chenu C, Adlanmerini M, Boudou F, Chantalat E, Guihot AL, Toutain C, et al. Testosterone Prevents Cutaneous Ischemia and Necrosis in Males Through Complementary Estrogenic and Androgenic Actions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017; 37(5): 909-19.
9. Brahm J, Brahm M, Segovia R, Latorre R, Zapata R, Poniachik J. Acute and fulminant hepatitis induced by flutamide: case series report and review of the literature. *Ann Hepatol*. 2011; 10(1): 93-8.
10. Majzoub A, Sabanegh E Jr. Testosterone replacement in the infertile man. *Transl Androl Urol*. 2016; 5(6): 859-65.
11. Pizzuti L, Natoli C, Gamucci T, Mauri M, Sergi D, Di Lauro L, et al. Anthropometric, clinical and molecular determinants of treatment outcomes in postmenopausal, hormone receptor positive metastatic breast cancer patients treated with fulvestrant. Results from a real world setting. *Oncotarget*. 2017; 8(40): 69025-37.
12. Torres-Chávez KE, Sanfins JM, Clemente-Napimoga JT, Pelegrini-Da-Silva A, Parada CA, Fischer L, et al. Effect of gonadal steroid hormones on formalin-induced temporomandibular joint inflammation. *Eur J Pain*. 2012; 16(2): 204-16.
13. Li YC, Ding XS, Li HM, Zhang Y, Bao J. Role of G protein-coupled estrogen receptor 1 in modulating transforming growth factor- β stimulated mesangial cell extracellular matrix synthesis and migration. *Mol Cell Endocrinol*. 2014; 391(1-2): 50-9.
14. Bábíčková J, Borbélyová V, Tóthová L, Kubišová K, Janega P, Hodosy J. The renal effects of prenatal testosterone in rats. *J Urol*. 2015; 193(5): 1700-8.
15. Kurling-Kailanto S, Kankaanpää A, Hautaniemi J, Seppälä T. Blockade of androgen or estrogen receptors reduces nandrolone's ability to modulate acute reward-related neurochemical effects of amphetamine in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav*. 2010; 95(4): 422-7.

16. Moussa L, Bézirard V, Salvador-Cartier C, Bacquié V, Houdeau E, Théodorou V. A new soy germ fermented ingredient displays estrogenic and protease inhibitor activities able to prevent irritable bowel syndrome-like symptoms in stressed female rats. *Clin Nutr.* 2013; 32(1): 51-8.
17. Vekariya KK, Kaur J, Tikoo K. Alleviating anastrozole induced bone toxicity by selenium nanoparticles in SD rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013; 268(2): 212-20.
18. Steffens JP, Coimbra LS, Ramalho-Lucas PD, Rossa C Jr, Spolidorio LC. The effect of supra and subphysiologic testosterone levels on ligature-induced bone loss in rats — a radiographic and histologic pilot study. *J Periodontol.* 2012; 83(11): 1432-9.
19. Fonseca TS. Resposta tecidual induzida por Biodentine e MTA Branco em subcutâneo de ratos [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.
20. Lai JJ, Lai KP, Chuang KH, Chang P, Yu IC, Lin WJ, et al. Monocyte/macrophage androgen receptor suppresses cutaneous wound healing in mice by enhancing local TNF- α expression. *J Clin Invest.* 2009; 119(12): 3739-51.
21. Steffens JP, Coimbra LS, Rossa C Jr, Kantarci A, Van Dyke TE, Spolidorio LC. Androgen receptors and experimental bone loss - an in vivo and in vitro study. *Bone.* 2015; 81: 683-90.
22. Wang Y, Simanainen U, Cheer K, Suarez FG, Gao YR, Li Z. Androgen actions in mouse wound healing: Minimal in vivo effects of local antiandrogen delivery. *Wound Repair Regen.* 2016; 24(3): 478-88.
23. Ishida Y, Gao JL, Murphy PM. Chemokine receptor CX3CR1 mediates skin wound healing by promoting macrophage and fibroblast accumulation and function. *J Immunol.* 2008; 180(1): 569–79.
24. Rohani MG, Chow YH, Razumova MV, Ash S, Hung CF, Schnapp LM. uPARAP function in cutaneous wound repair. *PLoS One.* 2014; 9(3): e92660.
25. Gudadappanavar AM, Hombal PR, Timashetti SS, Javali SB. Influence of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* on wound healing in male Wistar rats - an experimental study. *Int J Appl Basic Med Res.* 2017; 7(4): 233-8.
26. Ceruti JM, Leirós GJ, Balañá ME. Androgens and androgen receptor action in skin and hair follicles. *Mol Cell Endocrinol.* 2017; S0303-7207(17): 30492-6.
27. Goldberg MT, Han YP, Yan C, Shaw MC, Garner WL. TNF- α suppresses α -smooth muscle actin expression. In human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 2007; 127(11): 2645-55.
28. Gilliver SC, Ruckshanthi JP, Hardman MJ, Zeef LA, Ashcroft GS. 5 α -dihydrotestosterone (DHT) retards wound closure by inhibiting re-epithelialization. *J Pathol.* 2009; 217(1): 73-82.

4.3 Publicação 3

Nível suprafisiológico de testosterona previne a reabsorção óssea em ratos orquiectomizados*

Vinícius de Paiva Gonçalves¹, Patricia Milagros Huacho¹, João Paulo Steffens², Denise Madalena Palomari Spolidorio³, Carlos Rossa Junior¹, Luis C. Spolidorio³.

¹Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, SP, Brasil

²Departamento de Estomatologia, Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, PR, Brasil

³Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, SP, Brasil

Autor correspondente e endereço para correspondência: Luis Carlos Spolidorio, DDS, PhD. Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Rua. Humaitá, 1680 – Centro 14801-903, Araraquara – SP, Brasil. Tel: +55 (16) 3301-6479, Fax: +55 (16) 3301-6488 – lspolidorio@gmail.com

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaoatualizado.pdf>

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar se os níveis supra e subfisiológico de testosterona circulantes produzem efeitos sobre a reabsorção óssea experimental em calvária de ratos. Quarenta ratos foram divididos em 4 grupos: G1- Sem tratamento, G2- Durateston, G3- Orquiectomia (OQX) e G4- OQX+Durateston. No dia 0 os animais foram submetidos a orquiectomia e administração de durateston, e após 15 dias foi induzida reabsorção óssea inflamatória na calvária dos ratos. No dia 15 foi administrada, na linha média da calvária de ratos, injeção contendo 1000 μL de 4×10^9 UFC/mL de suspensão bacteriana de *P. gingivalis*; no dia 17, uma segunda inoculação foi realizada duas vezes ao dia, cada uma contendo 500 μL de 4×10^9 UFC/mL de suspensão bacteriana, e no dia 19, uma terceira e última injeção foi realizada, de acordo com o protocolo da segunda administração. Após 7 dias da primeira inoculação bacteriana, os animais foram eutanasiados para coleta das calvárias. Foram realizadas avaliação da porcentagem de tecido ósseo das calvárias através da análise de micromotografia computadorizada, quantificação do número de osteoclastos e pontos de reabsorção/lacunas de Howship (H&E), marcação de osteoclastos TRAP+ (imunohistoquímica), e avaliação da expressão de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , RANKL e OPG por ensaio multiplex. A OQX aumentou o número de pontos de reabsorção e de osteoclastos, assim como a atividade dos osteoclastos ($p < 0.05$), e o tratamento com durateston reduziu esses eventos e preservou o percentual de volume ósseo ($p < 0.05$). Os tratamentos reduziram IL-6 e OPG, OQX e OQX+DURA aumentaram a expressão de RANKL, e DURA reduziu RANKL ($p < 0.05$). O nível subfisiológico de testosterona mostrou tendência em aumentar a reabsorção óssea, enquanto a concentração suprafisiológica atuou preservando o percentual volume ósseo, o que parece ser decorrente da ação sobre RANKL-OPG e IL-6.

Palavras-chave: Reabsorção óssea. *Porphyromonas gingivalis*. Testosterona. Orquiectomia. Inflamação. Ratos.

INTRODUÇÃO

O remodelamento ósseo é essencial para a homeostase dos ossos adultos e compreende, basicamente, duas etapas: formação óssea e reabsorção. O equilíbrio entre as duas fases é crucial para sustentar a massa óssea e a homeostase mineral sistêmica¹. O processo de remodelação óssea é controlado por vários fatores locais e sistêmicos, expressos e liberados, de forma bem organizada, sendo a calcitonina (TC), hormônio paratiróide (PTH), vitamina D e o estrógeno, importantes reguladores hormonais no processo de remodelação óssea. A secreção dos três primeiros é conduzida pela exigência de controle do nível fisiológico de cálcio sérico. Além da regulação hormonal sistêmica, tornou-se cada vez mais evidente que fatores de crescimento como IGFs, TGF, FGFs, EGF, WNTs e BMPs desempenham papéis significativos na regulação da remodelação óssea fisiológica¹. O estrógeno é bem conhecido e intensamente estudado como regulador hormonal do osso no período pós-menopausa nas mulheres. No entanto, os andrógenos, de maneira geral, também têm vários efeitos benéficos no desenvolvimento e manutenção da massa óssea tanto nos homens quanto nas mulheres, relatando a literatura que a deficiência de andrógenos resulta em aumento da remodelação do tecido ósseo e perda óssea em homens^{1, 2}. Recentes evidências sugerem que os andrógenos possam inibir indiretamente a atividade de osteoclastos e a reabsorção óssea agindo sobre osteoblastos/osteócitos e o sistema RANK/RANKL/OPG^{1, 3}. A testosterona, por sua vez, estimula a proliferação de precursores de osteoblastos^{4, 5}, suprime sua apoptose^{6, 7}, e aumenta o efeito mitogênico do fator de crescimento de fibroblastos que diretamente estimula a diferenciação dessas células^{8, 9}. Fato é que, os andrógenos diretamente e indiretamente modulam as atividades de osteoblastos e osteoclastos, respectivamente, e podem manter a massa óssea através de receptores de andrógenos e estrógeno. A literatura relata que a depleção de andrógenos pela orquiectomia promove a proliferação e ativação de osteoclastos, resultando

em aumento da perda óssea¹⁰. In vitro, os andrógenos regulam a formação de osteoclastos e sua sobrevivência associados à via RANKL, além de atuar inibindo os níveis de OPG^{11,12}.

Diferentes modelos experimentais in vivo e in vitro, são utilizados com o propósito de investigar o processo de reabsorção óssea associada ou não à influência dos andrógenos. As alterações do metabolismo ósseo induzidas por andrógenos, como por exemplo a testosterona, são importantes por várias razões, tanto no impacto causado na compreensão dos processos fisiopatológicos do tecido quanto na aplicabilidade dos resultados no tratamento de doenças associadas^{13, 14}. Em camundongos, verifica-se que a administração de *Porphyromonas gingivalis* na calvária estimula resposta imune inata e adaptativa local, e estimula a diferenciação de osteoclastos e diminui a atividade de osteoblastos, implicando na reabsorção óssea. Porém, não é documentado na literatura o delineamento experimental de reabsorção óssea induzida por *Porphyromonas gingivalis* em calvária de ratos. Considerando-se o exposto acima, primeiramente desenvolvemos o protocolo de reabsorção óssea induzida por *P. gingivalis* em calvária de ratos e, após o estabelecimento do modelo de reabsorção óssea, investigamos se os níveis supra e subfisiológico de testosterona circulante produzem efeitos sobre a reabsorção óssea experimental em calvária de ratos.

MATERIAL E MÉTODO

Desenvolvimento do modelo de reabsorção óssea induzida por P. gingivalis em calvária de ratos

Cepas bacterianas, cultura e contagem

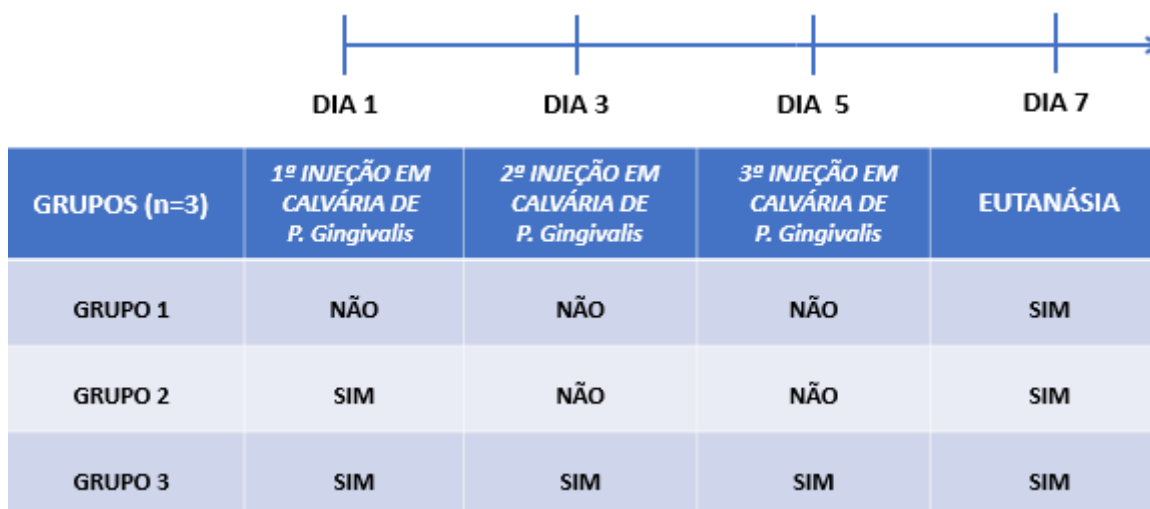
Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 foi cultivada em meio de ágar Brucella suplementado com 1 µL/mL de hemin, 0,1 µL/mL de menadiona e 5% de sangue de ovelha desfibrinada e, em seguida, mantida durante 72 horas em câmara de anaerobiose (80% de N₂, 10% de CO₂ e 10% de H₂) (Whitley MG-500- Estação anaeróbica) a 37°C, de acordo com as condições fisiológicas do microrganismo. Uma curva de crescimento bacteriano foi utilizada para

estabelecer a fase logarítmica ou exponencial, determinar a densidade óptica e a concentração do microrganismo em UFC/ml (unidades formadoras de colônias por mililitro). A densidade bacteriana foi mensurada através de espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm (Eppendorf AG, 22331, Hamburgo, Alemanha).

Animais

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (Processo CEUA/FOAr #47/2014). Nove ratos machos (*Rattus norvegicus* albinos, Holtzman), 2-3 meses de idade, foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos (n = 3/grupo), mantidos a uma temperatura de 23°C ±2, umidade de 65-75% e ciclo de luz controlado (12h luz-12h escuro), com ração e água disponível *ad libitum*. Bactérias vivas, *P. gingivalis* foram inoculadas na região da linha média da calvária de ratos, com auxílio de uma seringa estéril de uso único, de 1mL. Os animais do grupo 2 receberam uma injeção única de suspensão de bactérias contendo 100 µL de 4x10⁹ UFC/mL no primeiro dia do experimento. No grupo 3 os ratos receberam, no primeiro dia do experimento, 1000 µL de 4x10⁹ UFC/ mL e após 48h, outras duas inoculações de 500 µL de suspensão de bactérias contendo 4x10⁹ UFC/mL, respeitando um período de 6 horas entre uma inoculação e outra. No quinto dia após o início do experimento, realizou-se uma terceira e última inoculação, seguindo o mesmo protocolo da segunda administração. Os três ratos do grupo controle (grupo 1) não receberam inoculação bacteriana. Todos os ratos foram eutanasiados após 7 dias do início do experimento, e a calvária foi dissecada e fixada em paraformaldeído a 4% para análise de microtomografia computadorizada (micro-CT) e análise histológica (coloração H&E) (Figura 1).

Figura 1 - Representação da distribuição de ratos por grupo experimental.



No grupo 1 os animais não receberam injeção bacteriana, correspondendo ao grupo controle. Nos grupos 2 e 3 os animais receberam, respectivamente, injeção bacteriana contendo 100 μL de 4×10^9 UFC/ mL e 1000 μL de 4×10^9 UFC/ mL, de acordo com cada administração.

Fonte: Elaboração própria.

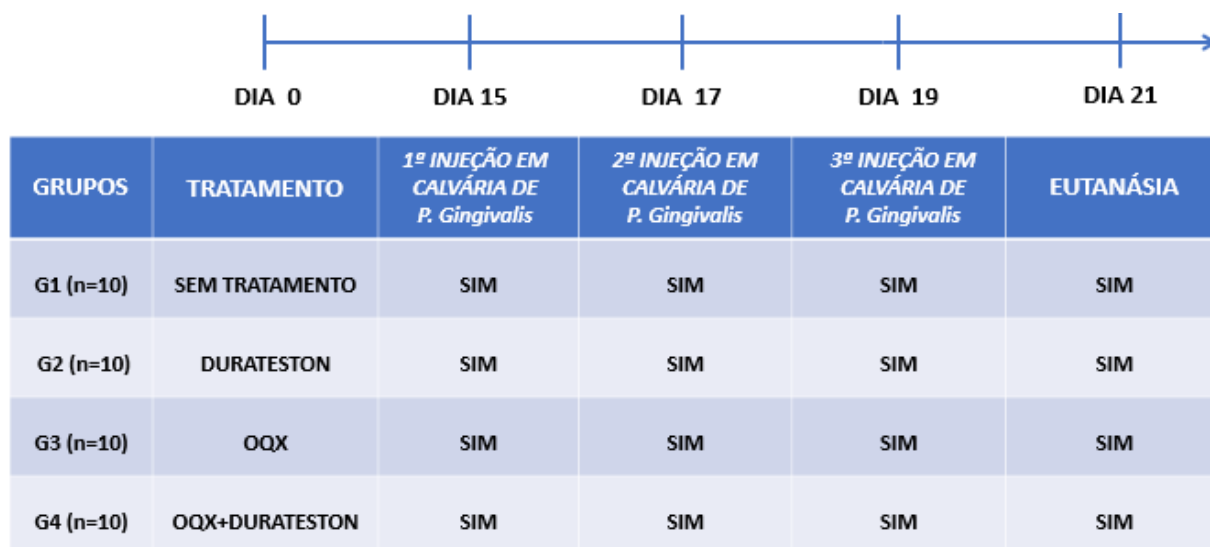
*Avaliação da influência de doses supra e subfisiológica de testosterona sobre a reabsorção óssea induzida por *P. gingivalis* em calvária de ratos*

Animais

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (Processo CEUA/FOAr #47/2014).

Quarenta ratos machos (*Rattus norvegicus* albinos, Holtzman), 3-4 meses de idade, foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (n = 10/grupo), mantidos a uma temperatura de $21^\circ\text{C} \pm 1$, umidade de 65-75% e ciclo de luz controlado (12h luz-12h escuro), com ração e água disponível *ad libitum*. Os grupos e condições experimentais são demonstrados na Figura 2.

Figura 2 - Representação da distribuição de ratos por grupo experimental.



OQX - Orquiectomia total (exposição, manipulação e remoção dos testículos). Todos os tratamentos foram iniciados 15 dias antes da inoculação de *P. gingivalis* na calvária.

Fonte: Elaboração própria.

Animais sem tratamento

Os animais deste grupo foram submetidos apenas a injeção de *Porphyromonas gingivalis* em calvária, e não foram castrados ou receberam tratamento com durateston, representando, portanto, o grupo de animais com nível fisiológico de testosterona (Figura 2).

Orquiectomia

Vinte ratos (n=10/grupo) foram anestesiados com solução de ketamina (1mL/Kg) e xilazina (0,4 mL/Kg) via intramuscular e, sob condições estéreis foi realizada incisão escrotal para remoção testicular bilateral. Após a retirada dos testículos, a bolsa escrotal foi suturada com fio de sutura reabsorvível. Após o ato cirúrgico os ratos foram tratados com ketoflex (0,03 ml/rato) por via intramuscular e, uma combinação de sais de benzilpenicilina e estreptomicina (Pentabiótico/0,2ml/rato, via intramuscular). Após o procedimento, os animais foram mantidos em gaiolas separadas para recuperação pós-cirúrgica durante uma semana (Figura 2). Esse procedimento foi realizado com o propósito de promover nível subfisiológico de testosterona nos animais.

Tratamento com testosterona (Durateston)

Os ratos orquiectomizados foram tratados semanalmente com 250 mg/kg de Durateston (Schering-Plough) diluído em 0,1 ml de óleo de milho por via intramuscular, para promover doses suprafisiológicas de testosterona¹⁵. O tratamento foi realizado até o final do período experimental (Figura 2). O tratamento foi realizado com o propósito de promover nível suprafisiológico de testosterona nos animais.

Análise do nível sérico de testosterona e Peso dos animais

Amostras de sangue caudal foram coletadas de cada animal no dia 0 (baseline), anterior à orquiectomia e administração de testosterona. No dia do sacrifício foram coletadas amostras de sangue de cada animal, por punção cardíaca, para avaliação da concentração hormonal final. O nível sérico de testosterona foi avaliado utilizando-se imunoensaio de quimioluminescência (Immulite 2000, Siemens Healthcare Diagnostics, Gwynedd, Reino Unido) no Laboratório de Análises Clínicas São Lucas/Araraquara-SP. O peso dos animais também foi registrado no momento da eutanásia (dia 21) e avaliado comparativamente ao peso obtido no dia 0.

*Inoculação de *Porphyromonas gingivalis* na região subcutânea na linha média da calvária*

As Cepas bacterianas, métodos de cultura e contagem foram estabelecidos como descrito anteriormente.

Quinze dias após a orquiectomia administrou-se na linha média da calvária de ratos 1000 µL de 4×10^9 UFC/mL de suspensão bacteriana; no dia 17, uma segunda inoculação foi realizada duas vezes ao dia, cada uma contendo 500 µL de 4×10^9 UFC/mL de suspensão bacteriana, e no dia 19, uma terceira e última injeção foi realizada, seguindo o mesmo protocolo da segunda administração. Os animais de todos os grupos foram eutanasiados no dia 21, correspondendo 7 dias após a primeira inoculação bacteriana.

Avaliação macroscópica e Coleta das amostras

No momento da eutanásia, avaliação macroscópica foi realizada para observação da presença de edema e exsudato sobre a calvária. Em seguida, o tecido cutâneo da calvária foi removido e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C . As amostras de calvária foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% durante 48 horas, em seguida lavadas em água corrente e transferidas para álcool 70%.

Microtomografia computadorizada (μCT)

As amostras de calvária foram escaneadas usando sistema de microtomografia computadorizada (Skyscan, Aartselaar, Bélgica). O escaneamento foi realizado com resolução de 18 μm , 80kV, 300 μA e filtro de atenuação de alumínio 0,5. Em cada amostra, foi padronizada uma região de interesse (ROI) entre a sutura anterior e posterior da calvária, e a fração do volume ósseo (volume ósseo/volume total - BV/TV, %) foi calculada pelo software CT-scan.

Análise microscópica

Após o escaneamento por microtomografia, todas as amostras foram descalcificadas em 10% de solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), desidratadas e depois incluídas em parafina em uma orientação espacial padronizada para obtenção de cortes semi-seriados de 5 μm de espessura no plano frontal, que foram corados posteriormente com hematoxilina e eosina (H&E). As imagens dos cortes histológicos foram capturadas usando uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada em um microscópio de luz comumente transmitida e objetiva de 40x (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemanha). Foram quantificados nos cortes histológicos, em toda a extensão da calvária, o número de osteoclastos e áreas de reabsorção, por um único examinador treinado e calibrado previamente.

Imunohistoquímica

Os cortes histológicos também foram utilizados para avaliar a imunomarcação de TRAP (K17 – sc-30833). O procedimento para imunohistoquímica foi padronizado (1:50) e as proteínas alvo foram detectadas usando o sistema DAB-estreptavidina (LSAB-2, Dako Cytomation). Os cortes foram corados com hematoxilina e as lamínulas montadas com Permount. As imagens foram capturadas usando uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio de luz comumente transmitida e objetiva de 40x (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemanha). Para a quantificação de osteoclastos TRAP⁺, foram consideradas as células com marcação castanh-claro, em toda a extensão da calvária, mensuradas por um único examinador treinado e calibrado previamente.

Expressão de citocinas inflamatórias locais (MULTIPLEX)

A concentração tecidual de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , RANKL e OPG nas amostras do tecido cutâneo adjacente a calvária foi avaliada por ensaio multiplex (Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho - LACTAD/UNICAMP - Campinas/SP). As amostras de proteínas totais foram extraídas com RIPA Lysis Buffer reagente, 10x (Merck, Millipore) e quantificadas pelo método BCA Protein Assay (Novagen, EMD Chemicals), de acordo com as instruções do fabricante. Para o ensaio multiplex, utilizou-se o Milliplex Kit (EMD Millipore), que fornece análise de diferentes analitos em um mesmo poço da placa, e o ensaio completo foi realizado de acordo com os protocolos de cada kit e as instruções do fabricante. Os resultados do ensaio foram normalizados dividindo-se pelos respectivos valores de proteína alvo obtidos na quantificação pelo método de ensaio de proteína BCA. Os dados gráficos foram expressos em fold-change.

Análise dos dados

Os dados foram submetidos aos testes de homogeneidade e distribuição usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, one-way ANOVA e o pós-teste de Tukey foram realizados

para análise comparativa entre os grupos, e o teste t para comparar o nível de testosterona final e inicial, assim como para comparar o peso dos animais. Todas as análises foram realizadas usando o software de análises estatísticas GraphPad Prism 6. Todos os testes foram aplicados com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

RESULTADOS

Desenvolvimento do modelo de reabsorção óssea induzida por P. gingivalis em calvária de ratos

A análise tridimensional das calvárias demonstrou que as repetidas injeções de *P. gingivalis* promoveram significativa redução da porcentagem óssea (BV/TV) na calvária dos animais do grupo 3 comparativamente aos grupos 1 e 2 (Figura 2A). A microtomografia computadorizada demonstrou a presença de áreas difusas de reabsorção óssea sobre a superfície da calvária dos animais do grupo 3, concentradas principalmente próximas à sutura sagital e caracterizadas como pontos irregulares não uniformes distribuídos sobre a superfície óssea (Figura 3B). Contrariamente, nos animais dos grupos 1 e 2 não observou-se pontos de reabsorção na superfície das calvárias. Os dados obtidos da análise de micro-CT foram confirmados pela avaliação descritiva dos cortes histopatológicos (H&E), observando-se presença de pontos de reabsorção e osteoclastos apenas nas calvárias dos animais pertencentes ao grupo 3 (Figura 3C).

Figura 3 – Resultados referentes ao estudo piloto. [Continua]

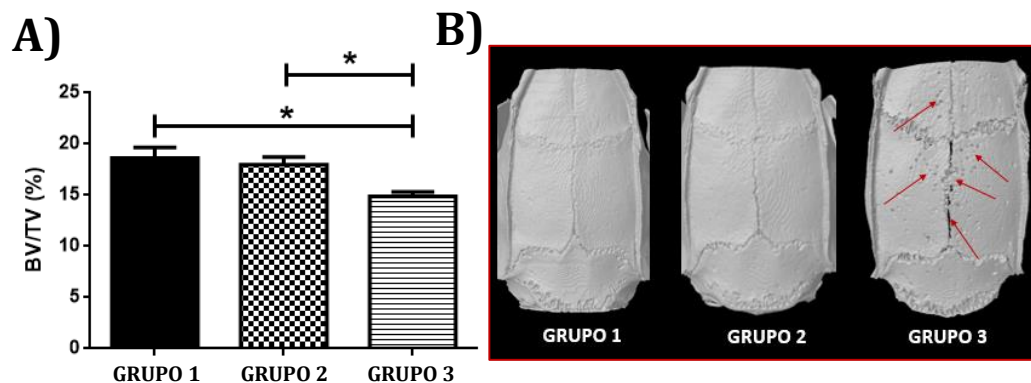
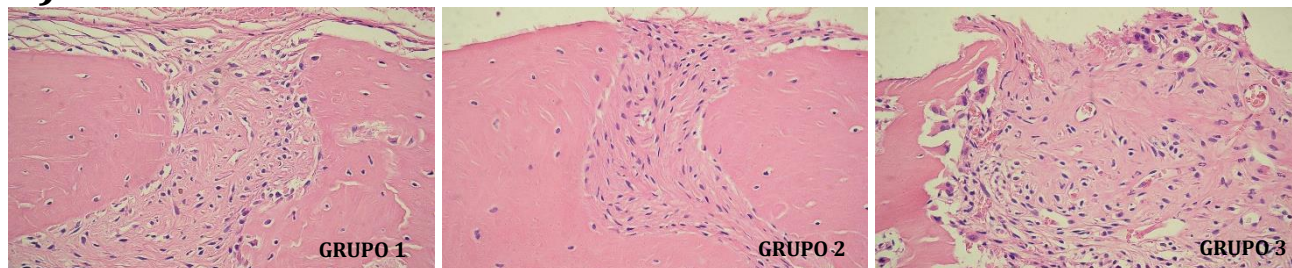


Figura 3 – Resultados referentes ao estudo piloto. [Conclusão]

C)



A) Médias da porcentagem óssea (%BV/TV) das calvárias dos animais ao fim de 7 dias. **B)** Imagens tridimensionais representativas de cada grupo experimental; setas em vermelho demonstram os pontos de reabsorção na calvária **C)** Imagens representativas de cada grupo experimental demonstrando a presença ou não de pontos de reabsorção e osteoclastos no tecido ósseo, avaliadas por coloração de H&E (40x). * $p < 0.05$ em relação ao grupo 3. Média (\pm DP).
Fonte: Elaboração própria.

*Influência de doses supra e subfisiológicas de testosterona sobre a reabsorção óssea induzida por *P. gingivalis* em calvária de ratos*

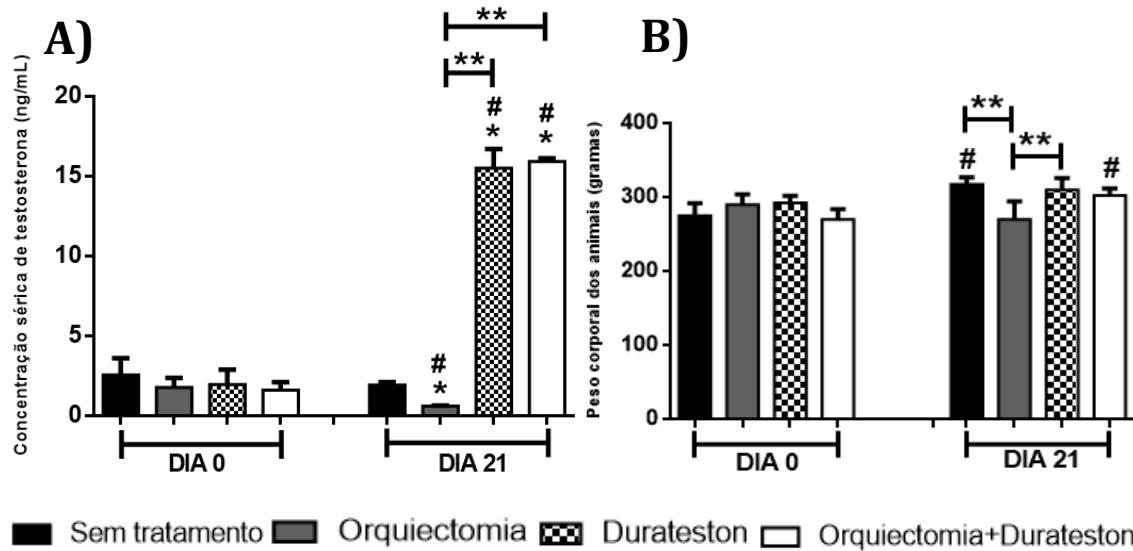
Aspectos macroscópicos

Ao final do período experimental, os animais de todos os grupos apresentaram edema subcutâneo sobre a calvária acompanhado da presença de exsudato, característicos de processo infeccioso e inflamatório.

Concentração sérica de testosterona e peso dos animais

Os valores de testosterona circulante foram similares entre todos os grupos no dia 0 ($p > 0.05$). Após orquiectomia, observou-se acentuada queda de testosterona comparando-se aos demais grupos ($p < 0.05$). Os valores de testosterona circulante dos grupos tratados com durateston foram superiores aos demais grupos ($p < 0.05$) (Figura 4A). O peso corporal dos animais manteve-se uniforme entre todos os grupos, exceto para o grupo de animais orquiectomizados que apresentaram redução significativa no peso quando comparados aos animais dos grupos sem tratamento e durateston ($p < 0.05$) (Figura 4B).

Figura 4 – Médias da concentração sérica de testosterona e peso corporal dos animais.



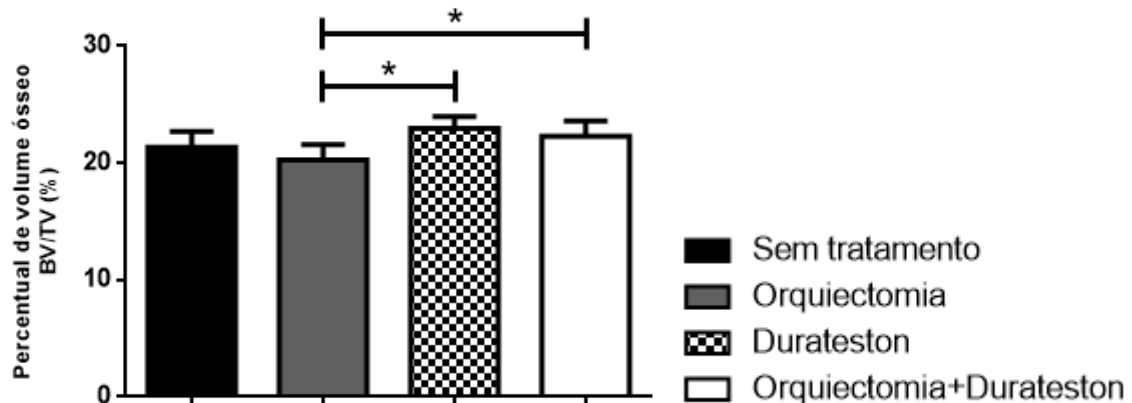
A) Médias da concentração sérica de testosterona circulante (ng/mL) e B) Médias do peso corporal dos animais, no período inicial (dia 0) e 21 dias após orquiectomia associada ou não com durateston. * $p < 0.05$ comparado ao grupo sem tratamento no dia 21, ** $p < 0.05$ comparado ao grupo orquiectomia no dia 21, # $p < 0.05$ comparando-se ao respectivo grupo no dia 0. Média (\pm DP).

Fonte: Elaboração própria.

A reabsorção óssea inflamatória é atenuada pela administração de Durateston

As Figuras 5 e 6 mostram os resultados da análise de microtomografia computadorizada para avaliação do percentual de volume ósseo (% BV/TV) da calvária dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos. Quando comparada ao grupo sem tratamento, a porcentagem de volume ósseo dos ratos orquiectomizados foi próxima ($p > 0.05$). O percentual de volume ósseo da calvária dos ratos tratados com durateston e orquiectomizados+durateston foi maior quando comparado aos demais grupos, diferença essa significativa em relação ao grupo OQX ($p < 0.05$).

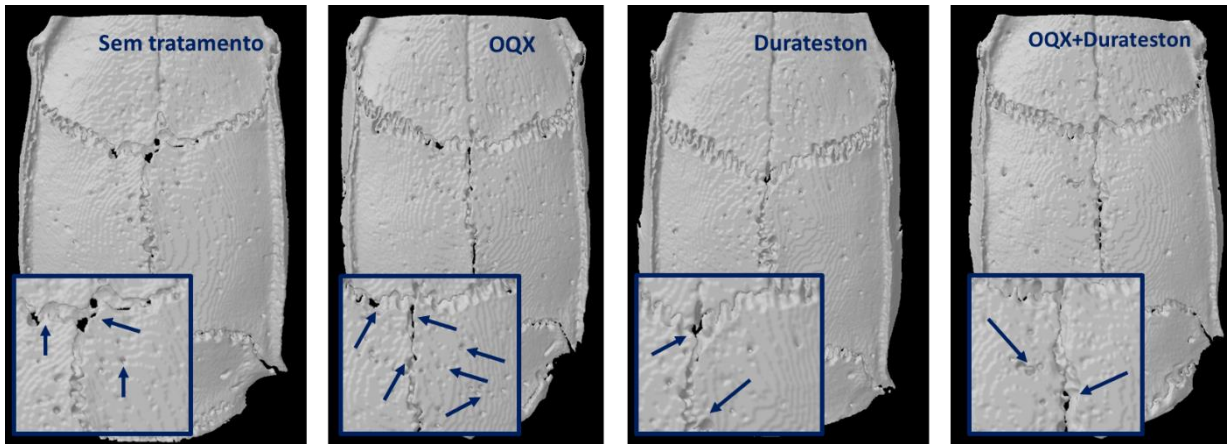
Figura 5 – Percentual de volume ósseo (% BV/TV) da calvária.



Os valores BV/TV foram maiores nos grupos de ratos tratados com durateston e orquiectomizados+durateston. * $p < 0.05$ em relação ao grupo orquiectomia. Média (\pm DP).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 6 – Imagens tridimensionais da calvária, representativas de cada grupo experimental.



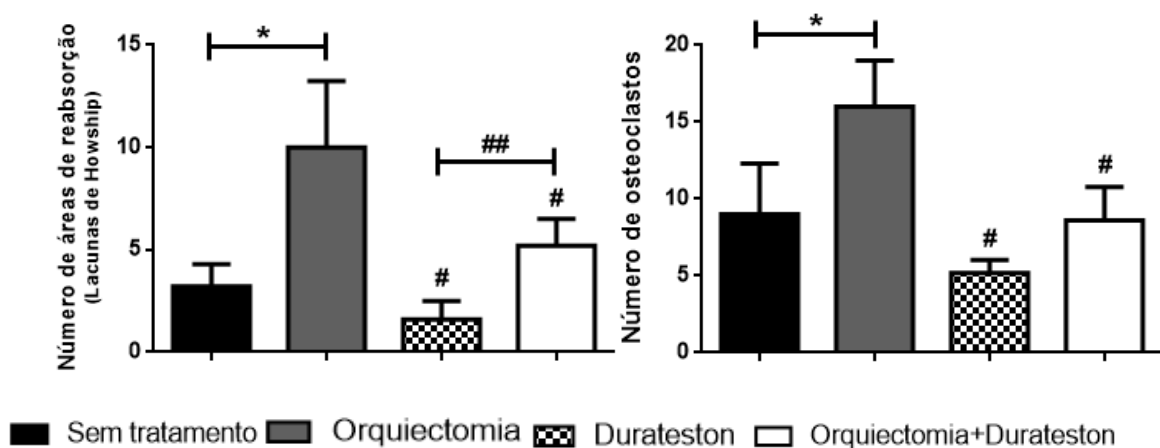
Nos quadros em destaque, as setas apontam os pontos de reabsorção distribuídos na superfície da calvária, e a reabsorção óssea nas suturas.

Fonte: Elaboração própria.

Terapia hormonal atenua a reabsorção óssea e número de osteoclastos

As Figuras 7 e 8 mostram que a densidade de volume das áreas de reabsorção induzida pela administração de *P. gingivalis*, foi diretamente proporcional a densidade volumétrica de osteoclastos. Houve aumento da densidade volumétrica de osteoclastos e das áreas reabsorvidas no grupo de ratos orquiectomizados ($p < 0.05$). Verificou-se diminuição da densidade volumétrica de osteoclastos e das áreas reabsorvidas nos grupos tratados com durateston comparados aos grupos sem tratamento e orquiectomia ($p > 0.05$).

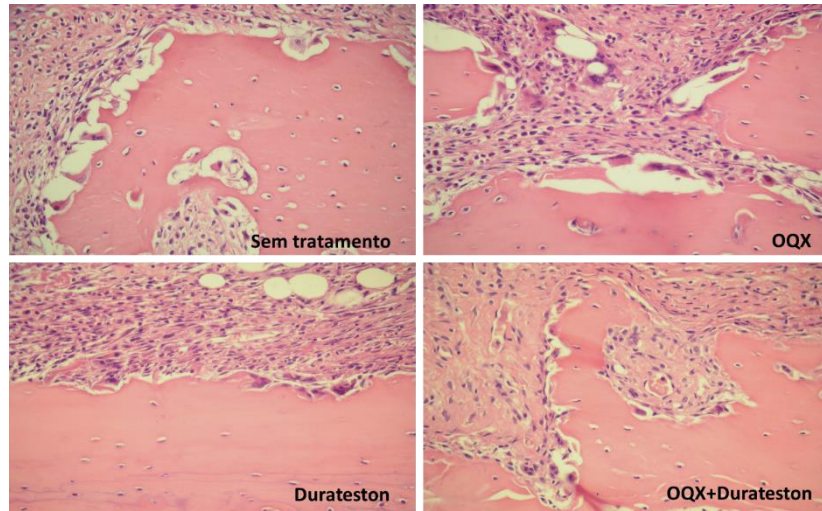
Figura 7 – Quantificação de áreas de reabsorção (Lacunas de Howship) e osteoclastos.



A orquiectomia e, conseqüente depleção hormonal, promoveu aumento do número de osteoclastos e pontos de reabsorção (Lacunas de Howship). * $p < 0.05$ comparado ao grupo sem tratamento, # $p < 0.05$ comparado ao grupo OQX, ## $p < 0.05$ comparado ao grupo durateston. Média (\pm DP).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 8 – Fotomicrografias dos cortes histológicos corados em H&E (40x)

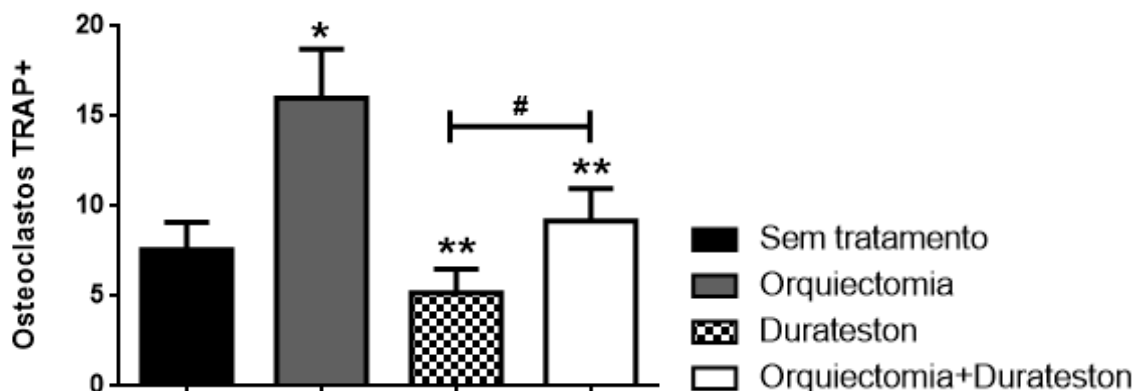


As imagens mostram o impacto da castração e administração de durateston sobre a perda óssea em calvária, induzida por *P. gingivalis*. Pode-se observar lacunas de Howship e osteoclastos distribuídos na superfície do osso.
Fonte: Elaboração própria.

A depleção de testosterona está associada a maior atividade de osteoclastos

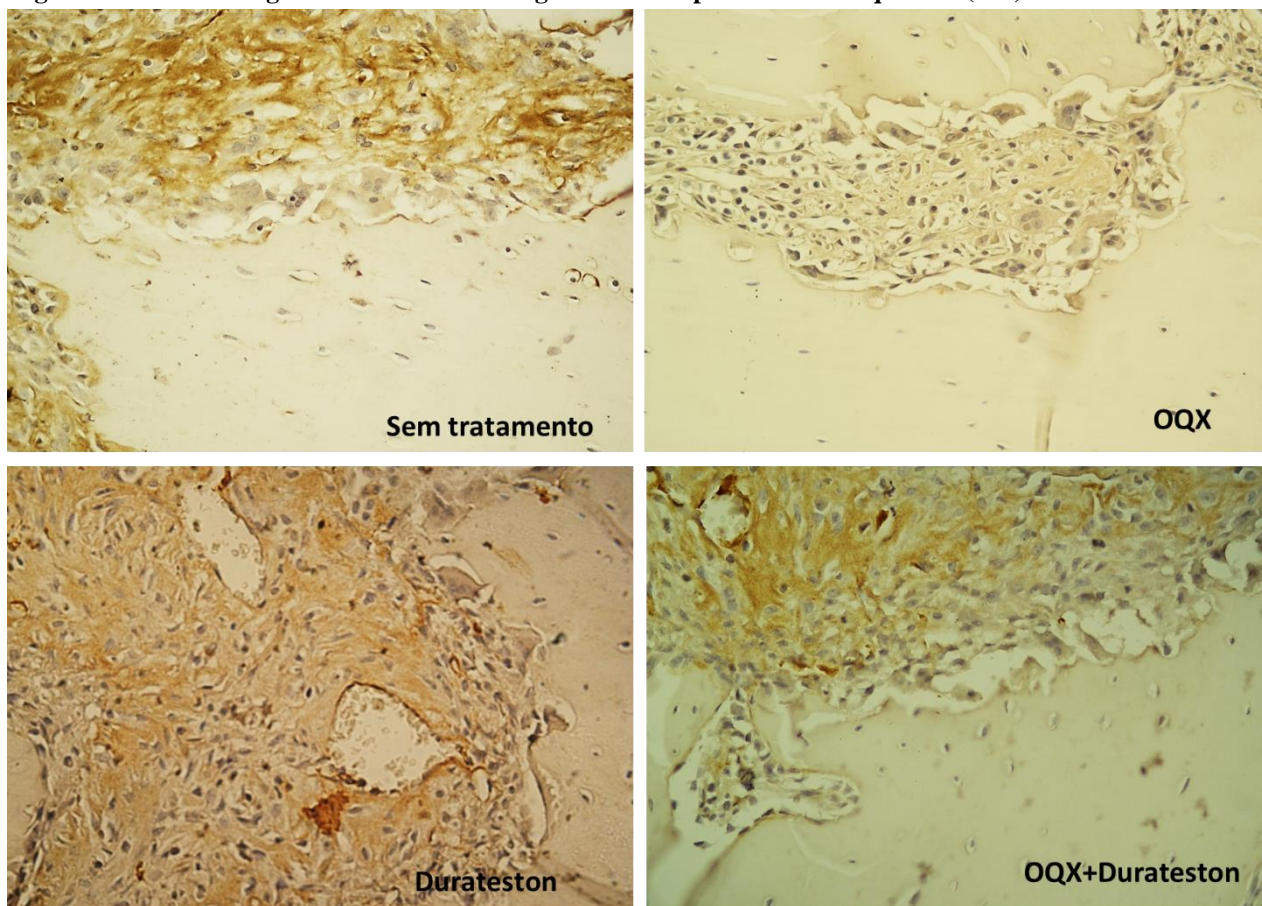
Verificou-se significativo aumento no número de osteoclastos TRAP+ na calvária dos animais orquiectomizados comparando-se aos demais grupos ($p < 0.05$). O tratamento com durateston, após a castração, foi capaz de manter a atividade de osteoclastos semelhante ao observado nos animais do grupo sem tratamento (Figuras 9 e 10).

Figura 9 – Médias da quantificação de osteoclastos TRAP+.



A orquiectomia aumentou de maneira significativa a atividade de osteoclastos. * $p < 0.05$ em relação ao grupo sem tratamento, ** $p < 0.05$ comparado ao grupo OQX, # $p < 0.05$ entre grupos. Média (\pm DP).
Fonte: Elaboração própria.

Figura 10 – Fotomicrografias de cortes histológicos corados por imunohistoquímica (40x).



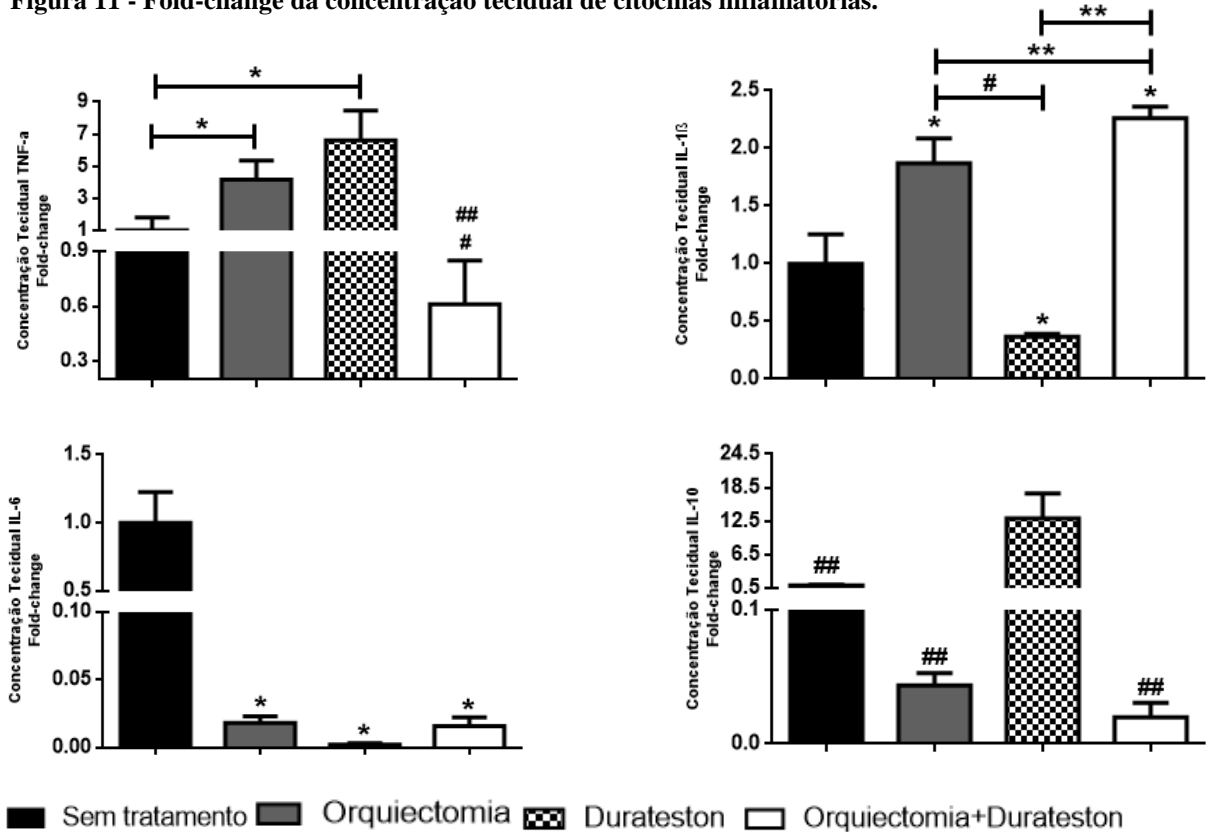
Os cortes histológicos foram submetidos à reação de imunohistoquímica para avaliação de osteoclastos TRAP+. As células imunomarcadas são coradas em castanho-claro, próximas à superfície óssea.

Fonte: Elaboração própria.

Variação hormonal atua de forma seletiva na expressão de citocinas inflamatórias

Foram analisadas no tecido subcutâneo adjacente à calvária, as concentrações de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10, para avaliar se níveis sub ou suprafisiológico de testosterona alteram a expressão de fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios teciduais, previamente detectados na presença de *P. gingivalis*. Os dados mostram que baixo nível de testosterona está associado com a alta expressão de IL-1 β e TNF- α e com baixa expressão de IL-6 e IL-10 ($p < 0.05$). O tratamento com durateston diminuiu significativamente a expressão de IL-1 β e IL-6 e aumentou TNF- α e IL-10 ($p < 0.05$). Verificou-se que a expressão das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 foram reduzidas pelo tratamento com durateston após a orquiectomia, enquanto o mesmo tratamento promoveu o aumento de IL-1 β ($p < 0.05$) (Figura 11).

Figura 11 - Fold-change da concentração tecidual de citocinas inflamatórias.



* $p < 0.05$ comparado ao grupo sem tratamento, ** $p < 0.05$ comparado ao grupo orquiectomia+durateston, # $p < 0.05$ em relação ao grupo orquiectomia, ## $p < 0.05$ em relação ao grupo durateston. Média (\pm DP).

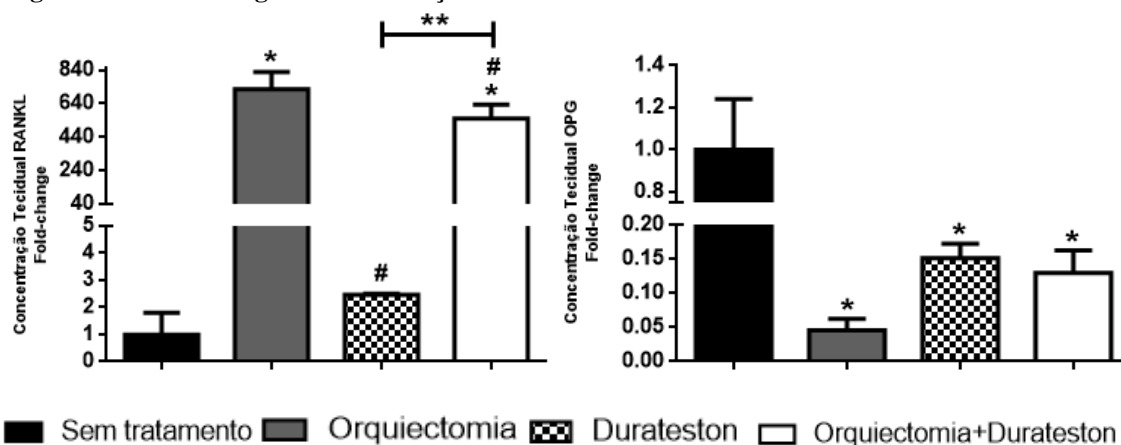
Fonte: Elaboração própria.

Orquiectomia eleva a produção de RANKL

Foi avaliado também se níveis sub ou supra fisiológico de testosterona alteram a expressão de RANKL e OPG, previamente detectados na presença de *P. gingivalis*.

A expressão de ambos foi modulada por todos os tratamentos, os quais promoveram acentuado aumento de RANKL e significativa redução de OPG tecidual ($p < 0.05$). A orquiectomia e administração de durateston causaram, respectivamente, aumento e redução de RANKL, enquanto a castração acompanhada de durateston aumentou a concentração tecidual do receptor-ligante ($p < 0.05$). Todos os tratamentos promoveram significativa redução de OPG (Figura 12).

Figura 12 - Fold-change da concentração tecidual de RANKL e OPG.



*p<0.05 comparado ao grupo sem tratamento, **p<0.05 comparado ao grupo orquiectomia+durateston, #p<0.05 em relação ao grupo orquiectomia. Média (\pm DP).

Fonte: Elaboração própria.

DISCUSSÃO

A manutenção da homeostase óssea resulta do equilíbrio entre o estado de mineralização e a massa óssea¹. As alterações da quantidade e qualidade do tecido ósseo é um achado comum em várias patologias do tecido ósseo, incluindo as metabólicas. Os distúrbios metabólicos podem ser resultado de alterações hormonais, incluindo os andrógenos¹. Uma possível correlação entre níveis sub e suprafisiológico de testosterona e afecção de várias patologias do tecido ósseo vem sendo estudadas de modo a facilitar o diagnóstico dessas condições^{9, 13, 16, 17}. Entretanto, não se sabe ao certo, até que ponto essas alterações são responsáveis pelas mais variadas afecções ósseas, incluindo àquelas de origem infecciosas. O modelo utilizando-se inoculação da bactéria viva em calvária é bem definido e amplamente empregado para responder diversas perguntas^{14, 18, 19, 20}. A metodologia utilizando-se *P. gingivalis* em calvária de camundongos contempla os vários eventos celulares e vasculares da inflamação poucas horas após o primeiro estímulo bacteriano. A reabsorção óssea é estabelecida entre 3 a 5 dias a partir do início da inoculação da *P. gingivalis*, dependendo da proporção do estímulo^{20, 21, 22}. No entanto, o modelo experimental descrito na literatura é restrito a camundongos, e não em ratos. O desenvolvimento do modelo de reabsorção óssea em calvária de ratos, utilizado no presente trabalho, foi baseado em trabalhos em camundongos, e a metodologia demonstra ser

bem tolerada e ativa na indução de reabsorção óssea em ratos. O delineamento experimental foi embasado e modificado a partir das considerações de registros da literatura^{14, 18, 23}. A efetividade do protocolo foi comprovada pelos resultados de microtomografia computadorizada (μ CT) e avaliação microscópica, os quais confirmaram a reabsorção óssea. A partir dos métodos de reabsorção óssea validados, avaliou-se o impacto dos níveis sub e suprafsiológico de testosterona sobre o processo de reabsorção do tecido ósseo em calvária de ratos. Utilizou-se orquiectomia e tratamento com doses de durateston para indução dos níveis sub e suprafsiológicos de testosterona circulante como estabelecido por Steffens et al.^{13, 15, 24}. A análise estereométrica complementou a análise por imagem. A partir dos resultados de ambas as análises constatou-se que a orquiectomia e consequente queda dos níveis de testosterona acentou a reabsorção óssea induzida por *P.gingivalis* e, por outro lado, verificou-se que o tratamento com Durateston associado ou não à orquiectomia, exibiu efeito sobre a calvária, preservando a porcentagem de volume ósseo. Corroborando com os dados do presente trabalho, Clarke e Khosla¹⁰ mostraram que a redução hormonal após orquiectomia está associada com a rápida perda óssea. Vários relatos da literatura mostram que a orquiectomia reduz o percentual de volume ósseo em fêmur e tíbia de ratos^{9, 17}, e que pode ser prevenido pela administração da testosterona em dose suprafsiológica⁹, como observado no presente trabalho. Resultados similares foram observados por Steffens et al.^{15, 24} que demonstraram, em modelo de periodontite em ratos, acentuada perda óssea alveolar associada a níveis subfsiológicos de testosterona enquanto a administração de durateston em dose suprafsiológica diminuiu a reabsorção¹⁵. A deficiência de testosterona circulante acentuou a diferenciação de osteoclastos observado através das análises histopatológica e imunohistoquímica, conforme também relatado em trabalhos anteriores^{24, 25, 26}. A reposição de testosterona em ratos orquiectomizados mostrou-se capaz de diminuir a porcentagem de osteoclastos sobre a superfície de tecido ósseo reabsorvido, como também relatado na literatura²⁵ e, trabalhos in vitro também relatam o

impacto da testosterona e di-hidrotestosterona na redução do número de osteoclastos^{11,24}. Huber et al.¹¹ avaliaram *in vitro* a proliferação de osteoclastos derivados de ratos orquiectomizados ou não, e observaram que a castração elevou o número de osteoclastos e, quando submetidas ao tratamento com di-hidrotestosterona em diferentes doses (0.1, 1 e 10 nM), a proliferação das células foi diminuída drasticamente comparando-se àquelas sem tratamento. De modo similar, Steffens et al.²⁴ verificaram em cultura de osteoclastos o efeito da testosterona nas doses de 1, 10 e 100 nM e verificaram que a redução das células foi proporcional ao aumento da concentração do hormônio. Esses dados, juntamente aos resultados do nosso trabalho, indicam que a concentração subfisiológica de testosterona está correlacionada ao aumento do número de osteoclastos e, conseqüentemente, a maior perda óssea, enquanto a testosterona em altas concentrações é capaz de reverter o impacto da orquiectomia.

A resposta imunoinflamatória constitui importante evento implicado ao processo de reabsorção óssea. Por exemplo, as interleucinas IL-1 β e IL-6 são importantes citocinas inflamatórias relacionadas à perda óssea, por atuarem regulando o número e atividade de osteoclastos^{24,27} e, ainda, pela modulação da produção de outras citocinas como TNF- α e IL-10²⁴, assim como as moléculas RANKL e osteoprotegerina (OPG) que desempenham importante papel na osteoclastogênese¹³. A ligação da molécula RANKL ao receptor RANK nas células precursoras de osteoclastos induz sua diferenciação, enquanto a osteoprotegerina regula essa atividade conjugando-se ao RANKL, impedindo a formação de osteoclastos²⁸.

Paralelamente, Huber et al.¹¹ descrevem que a testosterona controla a expressão de uma variedade de citocinas e fatores de crescimento como IL-1 β , TNF- α e IL-6 que associados à produção de RANKL e OPG constituem importante papel regulador da formação de osteoclastos. Complementando essas informações, Siddiqui e Partridge¹ afirmam que os andrógenos podem atuar sobre osteoblastos e o sistema RANKL/RANK/OPG e inibir indiretamente a atividade de osteoclastos e a reabsorção óssea.

No presente trabalho, o impacto dos níveis sub e supra fisiológico de testosterona foi seletivo sobre a expressão tecidual de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10, destacando-se o efeito supressor de todos os tratamentos sobre a produção de IL-6 comparando-se ao grupo sem tratamento. Esse resultado é parcialmente similar aos achados de Steffens et al.¹³ que observaram pouca influência do baixo e alto nível de testosterona sobre a expressão da interleucina-6 na presença de periodontite experimental em ratos, mantendo-se semelhante ao observado na presença de nível fisiológico do hormônio. A baixa expressão de IL-6, em nosso trabalho, parece ser um importante mecanismo associado a reabsorção óssea, balanceando a atividade pró-inflamatória decorrente da alta expressão de IL-1 β e TNF- α . Reforçando essa sugestão, Graves et al.²⁷ relata que em camundongos com deleção de IL-6, a perda óssea periodontal induzida por *P. gingivalis* é reduzida comparando-se aos animais com produção normal da interleucina²⁹, apontando sua contribuição para a progressão da perda óssea.

Em contrapartida à expressão da IL-6, a concentração tecidual de IL-1 β e TNF- α foi acentuadamente aumentada em resposta à orquiectomia e, quando administrado o durateston apenas ou após a orquiectomia, o nível das citocinas foi modulado de maneira distinta. No grupo DURA foi verificado aumento de TNF- α e redução de IL-1 β , enquanto no grupo OQX+DURA houve redução de TNF- α e aumento de IL-1 β . Considerando-se esses dados, sugerimos que a menor perda óssea observada nos grupos DURA e OQX+DURA seja decorrente do mecanismo de compensação na resposta imunoinflamatória associado à expressão de IL-1 β e TNF- α ; por outro lado, a elevada produção de ambas citocinas culminou com o favorecimento de maior perda óssea no grupo OQX. Recente trabalho avaliando o nível sérico de IL-1 β e TNF- α em ratos orquiectomizados, confirma nossos resultados, ao relatar o aumento fator de necrose tumoral e da interleucina devido ao baixo nível de testosterona³⁰. Os mesmos autores mostram que a administração supra fisiológica de testosterona após a orquiectomia preveniu o aumento sérico de IL-1 β não impedindo a elevação da produção de

TNF- α , contrariamente aos resultados do presente trabalho. Essa divergência deve ser ponderada, uma vez que avaliamos a produção das citocinas teciduais locais, enquanto no trabalho de Chin e Ima-Nirwana³⁰ foi abordada a avaliação a nível sistêmico. Acompanhando a expressão das citocinas pró-inflamatórias, avaliamos também a expressão da interleucina IL-10 que desempenha ação anti-inflamatória, e verificamos pouco impacto da orquiectomia seguida ou não da administração de durateston sobre a citocina, enquanto o tratamento apenas com durateston aumentou significativamente a produção de IL-10. Steffens et al.²⁴ investigaram in vitro diferentes doses de testosterona sobre a expressão de IL-10 e constataram que a maior dose do hormônio apresentou tendência em diminuir a concentração da interleucina. Esse dado sugere que altas concentrações de testosterona reduza a expressão da citocina anti-inflamatória, o que difere do nosso resultado que demonstra aumento significativo da IL-10 pelo tratamento com durateston. Entretanto é necessário considerar que no presente trabalho a dose de durateston foi acentuadamente maior e, além disso, a avaliação in vivo compreende a atuação de outras citocinas e vias exercendo ação sobre a expressão da interleucina. Sugerimos ainda, que a elevada concentração de IL-10 associada a redução significativa de IL-1 β e RANKL atuou modulando o número de osteoclastos e a redução da atividade reabsortiva dessas células, além de diminuir as áreas de reabsorção e promover maior preservação de volume ósseo, observados no grupo tratado apenas com durateston. Embasando essa ideia, Garlet et al.³¹ relatam que na patogênese da perda óssea periodontal estimulada por bactérias, ocorre um aumento inicial na proporção RANKL/OPG e, após a perda óssea inicial há produção de fatores anti-reabsortivos como por exemplo as interleucinas 4 e 10 (IL-4 e IL-10), que em conjunto e associadas a outros fatores reduzem a razão RANKL/OPG.

Associada aos resultados descritos, a concentração tecidual de RANKL e OPG também foi impactada pelos níveis sub e supra fisiológico de testosterona. A orquiectomia associada ou não ao durateston elevou acentuadamente a expressão de RANKL, enquanto a droga empregada

separadamente manteve baixo o nível tecidual do receptor ligante. A expressão de osteoprotegerina (OPG) foi inversamente proporcional aos níveis de RANKL, em todos os grupos. Esses dados correlacionam-se fortemente aos resultados da imunohistoquímica, mostrando que a orquiectomia promoveu aumento significativo de osteoclastos TRAP+ devido a alta produção de RANKL, mesmo acompanhada da terapia com durateston. Contrariamente, a administração isolada de durateston promoveu menor marcação de osteoclastos TRAP+ em resposta a menor produção de RANKL. Sugerimos que a baixa e elevada concentração de testosterona produzam efeito sobre a diferenciação de osteoclastos via RANKL-OPG, mas principalmente pela acentuada produção de RANKL. Esses resultados não estão de acordo com o trabalho de Ima-Nirwana e Chin⁹, em que foi avaliada a expressão de RANKL e OPG em fêmur e tibia de ratos orquiectomizados, e foi verificada produção similar ao grupo de animais com nível fisiológico de testosterona. Por outro lado, no mesmo trabalho os autores observaram que o nível suprafisiológico de testosterona em ratos orquiectomizados reduziu a expressão de RANKL comparando-se aos animais que foram submetidos apenas à orquiectomia, estando parcialmente de acordo com os resultados do nosso trabalho. Contudo, é necessário considerar que os achados de Ima-Nirwana e Chin⁹ foram obtidos após um período experimental de 8 semanas.

CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o nível subfisiológico de testosterona possui tendência em aumentar a reabsorção óssea, enquanto a concentração suprafisiológica atua preservando o percentual volume ósseo, o que parece ser decorrente principalmente pela ação via RANKL-OPG e IL-6.

REFERÊNCIAS

1. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological bone remodeling: systematic regulation and growth factor involvement. *Physiology (Bethesda)*. 2016; 31(3): 233-45.

2. Katznelson L, Finkelstein JS, Schoenfeld DA, Rosenthal DI, Anderson EJ, Klibanski A. Increase in bone density and lean body mass during testosterone administration in men with acquired hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81(12): 4358-65.
3. Frenkel B, Hong A, Baniwal SK, Coetzee GA, Ohlsson C, Khalid O, Gabet Y. Regulation of adult bone turnover by sex steroids. *J Cell Physiol.* 2010; 224(2): 305-10.
4. Nakano Y, Morimoto I, Ishida O, Fujihira T, Mizokami A, Tanimoto A, et al. The receptor, metabolism and effects of androgen in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone Miner.* 1994; 26(3): 245-59.
5. Damien E, Price J, Lanyon L. Mechanical strain stimulates osteoblast proliferation through the estrogen receptor in males as well as females. *J Bone Miner Res.* 2000; 15(11): 2169-77.
6. Wiren KM, Toombs AR, Semirale AA, Zhang X. Osteoblast and osteocyte apoptosis associated with androgen action in bone: requirement of increased Bax/Bcl-2 ratio. *Bone.* 2006; 38(5): 637-51.
7. Almeida M, Han L, Ambrogini E, Bartell SM, Manolagas SC. Oxidative stress stimulates apoptosis and activates NF- κ B in osteoblastic cells via a PKC β /p66shc signaling cascade: counter regulation by estrogens or androgens. *Mol Endocrinol.* 2010; 24(10): 2030-7.
8. Hofbauer LC, Hicok KC, Khosla S. Effects of gonadal and adrenal androgens in a novel androgen-responsive human osteoblastic cell line. *J Cell Biochem.* 1998; 71(1): 96-108.
9. Chin KY, Ima-Nirwana S. The effects of orchietomy and supraphysiological testosterone administration on trabecular bone structure and gene expression in rats. *Aging Male.* 2015; 18(1): 60-6.
10. Clarke BL, Khosla S. Androgens and bone. *Steroids.* 2009; 74(3): 296-305.
11. Huber DM, Bendixen AC, Pathrose P, Srivastava S, Dienger KM, Shevde NK, et al. Androgens suppress osteoclast formation induced by RANKL and macrophage-colony stimulating factor. *Endocrinology.* 2001; 142(9): 3800-8.
12. Hofbauer LC, Hicok KC, Chen D, Khosla S. Regulation of osteoprotegerin production by androgens and anti-androgens in human osteoblastic lineage cells. *Eur J Endocrinol* 2002; 147(2): 269-73.
13. Steffens JP, Herrera BS, Coimbra LS, Stephens DN, Rossa C Jr, Spolidorio LC, et al. Testosterone regulates bone response to inflammation. *Horm Metab Res.* 2014; 46(3): 193-200.
14. Li ZF, Cao LH, Wang Y, Zhang Z, Fan MW, Xu QA. Inhibitory effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammation and bone resorption in vivo. *Arch Oral Biol.* 2016; 72: 146-56.

15. Steffens JP, Coimbra LS, Ramalho-Lucas PD, Rossa C Jr, Spolidorio LC. The effect of supra- and subphysiologic testosterone levels on ligature-induced bone loss in rats – a radiographic and histologic pilot study. *J Periodontol.* 2012; 83(11): 1432-9.
16. Vandenput L, Boonen S, Van Herck E, Swinnen JV, Bouillon R, Vanderschueren D. Evidence from the aged orchidectomized male rat model that 17beta-estradiol is a more effective bone-sparing and anabolic agent than 5alpha-dihydrotestosterone. *J Bone Miner Res.* 2002; 17(11): 2080-6.
17. Libouban H, Moreau MF, Legrand E, Audran M, Baslé MF, Chappard D. Comparison of histomorphometric descriptors of bone architecture with dual-energy X-ray absorptiometry for assessing bone loss in the orchidectomized rat. *Osteoporos Int.* 2002; 13(5): 422-8.
18. Suzuki Y, Aoki K, Saito H, Umeda M, Nitta H, Baron R, Ohya K. A tumor necrosis factor-alpha antagonist inhibits inflammatory bone resorption induced by *Porphyromonas gingivalis* infection in mice. *J Periodontal Res.* 2006; 41(2): 81-91.
19. Meka A, Bakthavatchalu V, Sathishkumar S, Lopez MC, Verma RK, Wallet SM, et al. *Porphyromonas gingivalis* infection-induced tissue and bone transcriptional profiles. *Mol Oral Microbiol.* 2010; 25(1): 61-74.
20. Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C Jr. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Front Oral Biol.* 2012; 15: 117-32.
21. Li L, Khansari A, Shapira L, Graves D, Amar S. Contribution of interleukin- 11 and prostaglandin(s) in lipopolysaccharide-induced bone resorption in vivo. *Infect Immun.* 2002; 70(7): 3915-22.
22. He H, Liu R, Desta T, Leone C, Gerstenfeld L, Graves D. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology.* 2004; 145(1): 447-52.
23. Graves D, Naguib G, Lu H, Desta T, Amar S. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae are proinflammatory but do not play a prominent role in the innate immune response to *P. gingivalis*. *J Endotoxin Res.* 2005; 11(1): 13-8.
24. Steffens JP, Coimbra LS, Rossa C Jr, Kantarci A, Van Dyke TE, Spolidorio LC. Androgen receptors and experimental bone loss - an in vivo and in vitro study. *Bone.* 2015; 81: 683-90.
25. Laurent MR, Jardí F, Dubois V, Schollaert D, Khalil R, Gielen E, et al. Androgens have antiresorptive effects on trabecular disuse osteopenia independent from muscle atrophy. *Bone.* 2016; 93: 33-42.
26. Takayama K, Inoue T, Narita S, Maita S, Huang M, Numakura K, et al. Inhibition of the RANK/RANKL signaling with osteoprotegerin prevents castration-induced acceleration of bone metastasis in castration-insensitive prostate cancer. *Cancer Lett.* 2017; 397: 103-10.

27. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol.* 2011; 3: 21547019.
28. Nelson CA, Warren JT, Wang MW, Teitelbaum SL, Fremont DH. RANKL employs distinct binding modes to engage RANK and the osteoprotegerin decoy receptor. *Structure.* 2012; 20(11): 1971-82.
29. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun.* 1999; 67(6): 2804-9.
30. Chin KY, Ima-Nirwana S. The effects of testosterone deficiency and its replacement on inflammatory markers in rats: a pilot study. *Int J Endocrinol Metab.* 2017; 15(1): e43053. doi: 10.5812/ijem.43053.
31. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21(1): 12–20.

4.4 Publicação 4

Bloqueio de receptores de andrógenos acentua a reabsorção óssea *

Vinícius de Paiva Gonçalves¹, Patricia Milagros Huacho¹, João Paulo Steffens², Denise Madalena Palomari Spolidorio³, Carlos Rossa Junior¹, Luis C. Spolidorio³.

¹Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, SP, Brasil

²Departamento de Estomatologia, Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, PR, Brasil

³Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, SP, Brasil

Autor correspondente e endereço para correspondência: Luis Carlos Spolidorio, DDS, PhD. Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Rua. Humaitá, 1680 – Centro 14801-903, Araraquara – SP, Brasil. Tel: +55 (16) 3301-6479, Fax: +55 (16) 3301-6488 – lspolidorio@gmail.com

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaoatualizado.pdf>

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar se o bloqueio dos receptores de andrógenos e estrógeno, e a inibição da enzima aromatase, causam algum impacto sobre a reabsorção óssea experimental em calvária de ratos. Foram utilizados 50 ratos, divididos em 5 grupos experimentais: G1- Sem tratamento, G2- Anastrozol, G3- Flutamida, G4- Fulvestranto e G5-Durateston+Anastrozol. No dia 0 os animais foram submetidos ao tratamento farmacológico específico, de acordo com cada grupo experimental, e após 15 dias foi induzida reabsorção óssea inflamatória na calvária dos ratos. No dia 15 foi administrada, na linha média da calvária de ratos, injeção contendo 1000 μL de 4×10^9 UFC/mL de suspensão bacteriana de *P. gingivalis*; no dia 17, uma segunda inoculação foi realizada duas vezes ao dia, cada uma contendo 500 μL de 4×10^9 UFC/mL de suspensão bacteriana, e no dia 19, uma terceira e última injeção foi realizada, seguindo o mesmo protocolo da segunda administração. Após o período de 7 dias da primeira inoculação bacteriana, os animais foram eutanasiados para coleta das calvárias. Foram realizadas avaliação da porcentagem de volume ósseo das calvárias (% BV/TV) por microCT, quantificação do número de osteoclastos e pontos de reabsorção/lacunas de Howship (H&E), marcação de osteoclastos TRAP+ (imunohistoquímica), e avaliação da expressão de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , RANKL e OPG por ensaio multiplex. A terapia com anastrozol preservou o percentual de volume ósseo ($p < 0.05$). O número de pontos de reabsorção foi elevado pela flutamida, e a droga, assim como o fulvestranto, aumentaram a atividade de osteoclastos ($p < 0.05$). Os tratamentos reduziram a produção de IL-10 e OPG, e a flutamida e fulvestranto elevaram a expressão de RANKL ($p < 0.05$). Os resultados sugerem que a flutamida e fulvestranto favoreceram a atividade de osteoclastos, principalmente através de RANKL, mas apenas a flutamida acentuou a reabsorção óssea.

Palavras-chave: Reabsorção óssea. *Porphyromonas gingivalis*. Androgênios. Inflamação. Ratos.

INTRODUÇÃO

O osso é um tecido dinâmico, continuamente reabsorvido, renovado e remodelado, processo esse essencial na homeostase do tecido ósseo, e que é coordenado basicamente por dois mecanismos, formação e reabsorção óssea, que promovem a manutenção da fisiologia óssea quando ocorrem de maneira balanceada¹. Esses processos são desenvolvidos por inúmeros tipos de células ósseas as quais são reguladas por vários fatores transcricionais, citocinas, fatores de crescimento e hormônios².

Siddiqui e Partridge¹ descrevem a calcitonina (TC), hormônio paratiróide (PTH), vitamina D e o estrógeno, como importantes reguladores hormonais no processo de remodelação óssea. A secreção dos três primeiros é conduzida pela exigência de controle do nível fisiológico de cálcio sérico. Além da regulação hormonal sistêmica, tornou-se cada vez mais evidente que diversos fatores de crescimento desempenham papéis significativos na regulação da remodelação óssea fisiológica¹.

A literatura relata que a deleção de receptores de andrógenos (RA) em camundongos resulta em elevado turnover ósseo, aumentando a reabsorção e reduzindo o volume ósseo cortical e trabecular, decorrente da diminuição da formação de tecido ósseo³ e, de maneira pertinente, outros estudos também mostram que a inativação de RA eleva a atividade de reabsorção óssea e inibe a mineralização do tecido ósseo^{4,5}, enquanto o papel dos receptores de estrógeno (RE) sobre o metabolismo ósseo é pouco elucidado^{6,7}. Ainda, Steffens et al.⁸ descreveram em modelo de periodontite experimental em ratos, que o bloqueio de receptores de andrógenos promove elevada perda óssea alveolar, associada ao aumento de infiltrado inflamatório e número de osteoclastos, e redução de IL-6.

Contudo, os dados presentes na literatura são escassos e não conclusivos no que diz respeito ao papel dos andrógenos e seus receptores na reabsorção óssea inflamatória, estabelecendo-se assim, diferentes metodologias de estudo para investigar esse processo associado ou não à

influência hormonal como, por exemplo, a utilização da *Porphyromonas gingivalis* administrada em calvária de animais^{9,10}. Em camundongos, verifica-se que a administração de *P. gingivalis* na calvária estimula resposta imune inata e adaptativa local, a diferenciação de osteoclastos e diminui a atividade de osteoblastos, implicando na reabsorção óssea. No entanto, o delineamento experimental de reabsorção óssea induzida por *Porphyromonas gingivalis* em calvária de ratos não é documentado na literatura. Sendo assim, desenvolvemos o protocolo de reabsorção óssea induzida por *P. gingivalis* em calvária de ratos e, após o estabelecimento do modelo de reabsorção óssea, investigamos se o bloqueio dos receptores de andrógenos e estrógeno, e a inibição da enzima aromatase, causam algum impacto sobre a reabsorção óssea experimental em calvária de ratos.

MATERIAL E MÉTODO

Desenvolvimento do modelo de reabsorção óssea induzida por P. gingivalis em calvária de ratos


Cepas bacterianas, cultura e contagem

Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 foi cultivada em meio de ágar Brucella suplementado com 1 µL/mL de hemin, 0,1 µL/mL de menadiona e 5% de sangue de ovelha desfibrinada e, em seguida, mantida durante 72 horas em câmara de anaerobiose (80% de N₂, 10% de CO₂ e 10% de H₂) (Whitley MG-500- Estação anaeróbica) a 37°C, de acordo com as condições fisiológicas do microrganismo. Uma curva de crescimento bacteriano foi utilizada para estabelecer a fase logarítmica ou exponencial, determinar a densidade óptica e a concentração do microrganismo em UFC/ml (unidades formadoras de colônias por mililitro). A densidade bacteriana foi mensurada através de espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm (Eppendorf AG, 22331, Hamburgo, Alemanha).

Animais

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (Processo CEUA/FOAr #47/2014). Nove ratos machos (*Rattus norvegicus* albinos, Holtzman), 2-3 meses de idade, foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos (n = 3/grupo), mantidos a uma temperatura de 23°C ±2, umidade de 65-75% e ciclo de luz controlado (12h luz-12h escuro), com ração e água disponível *ad libitum*. Bactérias vivas, *P. gingivalis* foram inoculadas na região da linha média da calvária de ratos, com auxílio de uma seringa estéril de uso único, de 1mL. Os animais do grupo 2 receberam uma injeção única de suspensão de bactérias contendo 100 µL de 4x10⁹ UFC/mL no primeiro dia do experimento. Os ratos do grupo 3 receberam, no primeiro dia do experimento, 1000 µL de 4x10⁹ UFC/ mL e após 48h, outras duas inoculações de 500 µL de suspensão de bactérias contendo 4x10⁹ UFC/mL, respeitando um período de 6 horas entre uma inoculação e outra. No quinto dia após o início do experimento, realizou-se uma terceira e última inoculação, seguindo o mesmo protocolo da segunda administração. Os três ratos do grupo controle (grupo 1) não receberam inoculação bacteriana. Todos os ratos foram eutanasiados após 7 dias do início do experimento, e a calvária foi dissecada e fixada em paraformaldeído a 4% para análise de microtomografia computadorizada (micro-CT) e análise histopatológica (coloração H&E) (Figura 1).

Figura 1 - Representação da distribuição de ratos por grupo experimental.



GRUPOS (n=3)	1ª INJEÇÃO EM CALVÁRIA DE <i>P. Gingivalis</i>	2ª INJEÇÃO EM CALVÁRIA DE <i>P. Gingivalis</i>	3ª INJEÇÃO EM CALVÁRIA DE <i>P. Gingivalis</i>	EUTANÁSIA
GRUPO 1	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
GRUPO 2	SIM	NÃO	NÃO	SIM
GRUPO 3	SIM	SIM	SIM	SIM

No grupo 1 os animais não receberam injeção bacteriana, correspondendo ao grupo controle. Nos grupos 2 e 3 os animais receberam, respectivamente, injeção bacteriana contendo 100 µL de 4x10⁹ UFC/ mL e 1000 µL de 4x10⁹ UFC/ mL, de acordo com cada administração.


Fonte: Elaboração própria.

Avaliação da influência do bloqueio de receptores de andrógenos e estrógeno, e inibição da enzima aromatase sobre a reabsorção óssea induzida por P. gingivalis em calvária de ratos

Animais

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (Processo CEUA/FOAr #47/2014). Cinquenta ratos machos (*Rattus norvegicus* albinos, Holtzman), 3-4 meses de idade, foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos (n = 10/grupo), mantidos a uma temperatura de 21°C ±1, umidade de 65-75% e ciclo de luz controlado (12h luz-12h escuro), com ração e água disponível *ad libitum*. Os grupos e condições experimentais são demonstrados na Figura 2.

Figura 2 - Representação da distribuição de ratos por grupo experimental.



GRUPOS	TRATAMENTO	1ª INJEÇÃO EM CALVÁRIA DE <i>P. Gingivalis</i>	2ª INJEÇÃO EM CALVÁRIA DE <i>P. Gingivalis</i>	3ª INJEÇÃO EM CALVÁRIA DE <i>P. Gingivalis</i>	EUTANÁSIA
G1 (n=10)	SEM TRATAMENTO	SIM	SIM	SIM	SIM
G2 (n=10)	ANASTROSOL	SIM	SIM	SIM	SIM
G3 (n=10)	FLUTAMIDA	SIM	SIM	SIM	SIM
G4 (n=10)	FULVESTRANTO	SIM	SIM	SIM	SIM
G5 (n=10)	DURATESTON+ANASTROSOL	SIM	SIM	SIM	SIM

Todos os tratamentos foram iniciados 15 dias anteriores a injeção de *P. gingivalis* em calvária.
Fonte: Elaboração própria.

Animais sem tratamento

Os animais deste grupo foram submetidos apenas a injeção de *Porphyromonas gingivalis* em calvária, e não receberam tratamento farmacológico específico, representando o grupo de animais com nível fisiológico de testosterona (Figura 2).

Inibição farmacológica de receptores de andrógeno, Inibição farmacológica de receptores de estrógeno e Inibição farmacológica da enzima aromatase

Respeitando os grupos experimentais, os animais foram tratados com um dos protocolos a seguir: i - 50 mg/kg de peso corporal flutamida (F9397, Sigma-Aldrich) via gavagem oral, a cada 02 dias¹¹, com o propósito de bloquear a ação da testosterona; ii - 1,5 mg/kg de peso corporal/dia de fulvestranto (I4409, Sigma-Aldrich), via subcutânea¹², com o propósito de bloquear a ação do estrógeno e permitir ação apenas da testosterona; iii - 0,2 mg/kg de peso corporal/dia de anastrozol (A273, Sigma-Aldrich) via gavagem oral¹³, com o propósito de bloquear a conversão de testosterona em estrógeno e, dessa forma, permitir apenas a ação da testosterona (Figura 2).

Tratamento com testosterona (Durateston)

Foi realizada semanalmente a administração de 250 mg/kg de durateston (Schering-Plough) diluído em 0,1 ml de óleo de milho por via intramuscular, para promover níveis suprafisiológicos de testosterona¹⁴. O tratamento foi realizado até o final do período experimental, com o propósito de promover nível suprafisiológico de testosterona nos animais (Figura 2).

Análise do nível sérico de testosterona e Peso dos animais

Amostras de sangue caudal foram coletadas de cada animal no dia 0 (baseline), anterior à administração das drogas. No dia do sacrifício foram coletadas amostras de sangue de cada animal, por punção cardíaca, para avaliação da concentração hormonal final. O nível sérico de testosterona foi avaliado utilizando-se imunoensaio de quimioluminescência (Immulite 2000, Siemens Healthcare Diagnostics, Gwynedd, Reino Unido) no Laboratório de Análises Clínicas São Lucas/Araraquara-SP.

O peso dos animais também foi registrado no momento da eutanásia (dia 21) e avaliado comparativamente ao peso obtido no dia 0.

Inoculação de Porphyromonas gingivalis na região subcutânea na linha média da calvária

As Cepas bacterianas, métodos de cultura e contagem foram estabelecidos como descrito anteriormente.

Quinze dias após a administração dos fármacos foi realizada na linha média da calvária de ratos a inoculação de 1000 μ L de 4×10^9 UFC/mL de suspensão bacteriana; no dia 17, uma segunda inoculação foi realizada duas vezes ao dia, cada uma contendo 500 μ L de 4×10^9 UFC/mL de suspensão bacteriana, e no dia 19, uma terceira e última injeção foi realizada, seguindo o mesmo protocolo da segunda administração. Os animais de todos os grupos foram eutanasiados no dia 21, correspondendo 7 dias após a primeira inoculação bacteriana.

Avaliação macroscópica e Coleta das amostras

No momento da eutanásia, avaliação macrocópica foi realizada para observação da presença de edema e exsudato sobre a calvária. Em seguida, o tecido cutâneo da calvária foi removido e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C . As amostras de calvária foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% durante 48 horas, em seguida lavadas em água corrente e transferidas para álcool 70%.

Microtomografia computadorizada (μ CT)

As amostras de calvária foram escaneadas usando sistema de microtomografia computadorizada (Skyscan, Aartselaar, Bélgica). O escaneamento foi realizado com resolução de 18 μ m, 80kV, 300 μ A e filtro de atenuação de alumínio 0,5. Em cada amostra, foi padronizada uma região de interesse (ROI) entre a sutura anterior e posterior da calvária, e a fração do volume ósseo (volume ósseo/volume total - BV/TV, %) foi calculada pelo software CT-scan.

Análise microscópica

Após o escaneamento por microtomografia, todas as amostras foram descalcificadas em 10% de solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), desidratadas e depois incluídas em parafina em uma orientação espacial padronizada para obtenção de cortes semi-seriados de 5 µm de espessura no plano frontal, que foram corados posteriormente com hematoxilina e eosina (H&E). As imagens dos cortes histológicos foram capturadas usando uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada em um microscópio de luz comumente transmitida e objetiva de 40x (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemanha). Foram quantificados nos cortes histológicos, em toda a extensão da calvária, o número de osteoclastos e áreas de reabsorção, por um único examinador treinado e calibrado previamente.

Imunohistoquímica

Os cortes histológicos também foram utilizados para avaliar a imunomarcação de TRAP (K17 – sc-30833). O procedimento para imunohistoquímica foi padronizado (1:50) e as proteínas alvo foram detectadas usando o sistema DAB-estreptavidina (LSAB-2, Dako Cytomation). Os cortes foram corados com hematoxilina e as lamínulas montadas com Permount. As imagens foram capturadas usando uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio de luz comumente transmitida e objetiva de 40x (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemanha). Para a quantificação de osteoclastos TRAP+, foram consideradas as células com marcação castanho claro, em toda a extensão da calvária, mensuradas por um único examinador treinado e calibrado previamente.

Expressão de citocinas inflamatórias locais (MULTIPLEX)

A concentração tecidual de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , RANKL e OPG nas amostras do tecido cutâneo adjacente a calvária foi avaliada por ensaio multiplex (Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho - LACTAD/UNICAMP - Campinas/SP). As amostras de proteínas totais foram extraídas com RIPA Lysis Buffer reagente, 10x (Merck, Millipore) e

quantificadas pelo método BCA Protein Assay (Novagen, EMD Chemicals), de acordo com as instruções do fabricante. Para o ensaio multiplex, utilizou-se o Milliplex Kit (EMD Millipore), que fornece análise de diferentes analitos em um mesmo poço da placa, e o ensaio completo foi realizado de acordo com os protocolos de cada kit e as instruções do fabricante. Os resultados do ensaio foram normalizados dividindo-se pelos respectivos valores da proteína alvo obtidos na quantificação pelo método de ensaio de proteína BCA. Os dados gráficos foram expressos em fold-change.

Análise dos dados

Os dados foram submetidos aos testes de homogeneidade e distribuição usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, one-way ANOVA e o pós-teste de Tukey foram realizados para análise comparativa entre os grupos, e o teste t para comparar o nível de testosterona inicial e final, assim como para comparar o peso dos animais. Todas as análises foram realizadas usando o software de análises estatísticas GraphPad Prism 6. Todos os testes foram aplicados com um nível de confiança de 95% ($p < 0.05$). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

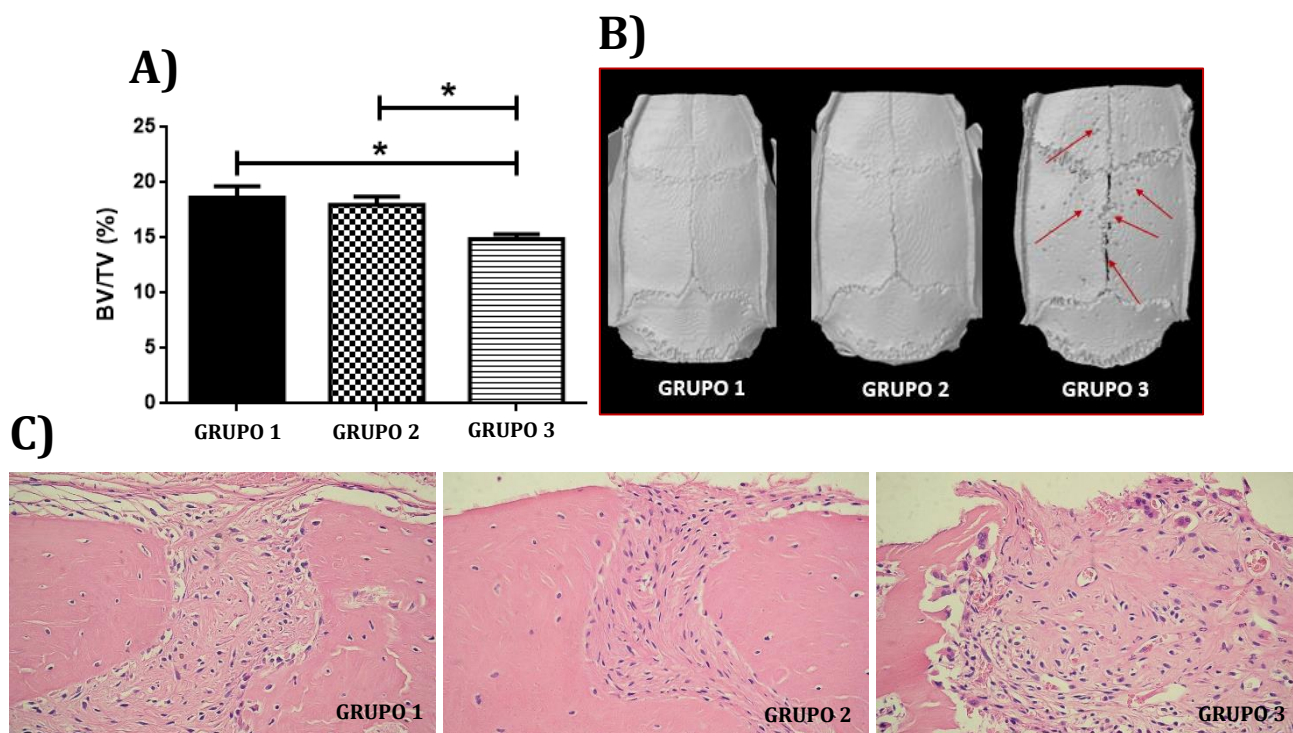
RESULTADOS

*Desenvolvimento do modelo de reabsorção óssea induzida por *P. gingivalis* em calvária de ratos*

A análise tridimensional das calvárias demonstrou que as repetidas injeções de *P. gingivalis* promoveram significativa redução da porcentagem óssea (BV/TV) na calvária dos animais do grupo 3 comparativamente aos grupos 1 e 2 (Figura 3A). A microtomografia computadorizada demonstrou a presença de áreas difusas de reabsorção óssea sobre a superfície da calvária dos animais do grupo 3, concentradas principalmente próximas à sutura sagital e caracterizadas como pontos irregulares não uniformes distribuídos sobre a superfície óssea (Figura 3B). Contrariamente, nos animais dos grupos 1 e 2 não observou-se pontos de reabsorção na superfície

das calvárias. Os dados obtidos da análise de micro-CT foram confirmados pela avaliação descritiva dos cortes histopatológicos (H&E), observando-se presença de pontos de reabsorção e osteoclastos apenas nas calvárias dos animais pertencentes ao grupo 3 (Figura 3C).

Figura 3 – Resultados referentes ao estudo piloto.



A) Médias da porcentagem óssea (BV/TV) das calvárias dos animais ao fim de 7 dias. **B)** Imagens tridimensionais representativas de cada grupo experimental; setas em vermelho demonstram os pontos de reabsorção na calvária **C)** Imagens representativas de cada grupo experimental demonstrando a presença ou não de pontos de reabsorção e osteoclastos no tecido ósseo, avaliadas através de cortes corados em H&E (40x). * $p < 0.05$ em relação ao grupo 3. Média (\pm DP).

Fonte: Elaboração própria.

*Avaliação da influência do bloqueio de receptores de andrógenos e estrógeno, e inibição da enzima aromatase sobre a reabsorção óssea induzida por *P. gingivalis* em calvária de ratos*

Aspectos macroscópicos

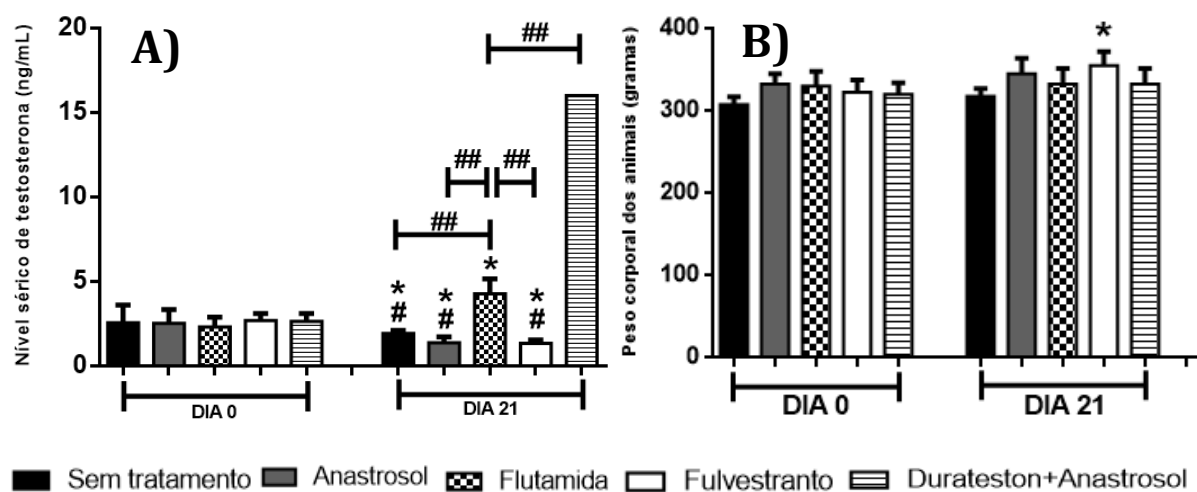
Ao final do período experimental, os animais de todos os grupos experimentais apresentaram edema subcutâneo sobre a calvária acompanhado da presença de exsudato característicos de processo infeccioso e inflamatório.

Nível sérico de testosterona e peso dos animais

Os valores de testosterona circulante foram similares entre todos os grupos no dia 0 ($p > 0.05$). O nível sérico do hormônio foi similar entre os grupos sem tratamento, ANA e FULV ($p > 0.05$), diferindo-se significativamente dos grupos tratados com flutamida (FLUTA) e durateston+anastrozol (DURA+ANA), que apresentaram altos níveis de testosterona ($p < 0.05$). Ainda, comparando-se os grupos FLUTA e DURA+ANA, nesse último o nível hormonal foi acentuadamente superior ao FLUTA ($p < 0.05$) (Figura 4A).

A média do peso corporal dos animais manteve-se uniforme entre todos os grupos, havendo aumento significativo apenas no grupo fulvestranto analisando-se comparativamente no dia 0 e 21 (Figura 4B).

Figura 4 – Médias do nível sérico de testosterona e peso corporal dos animais.



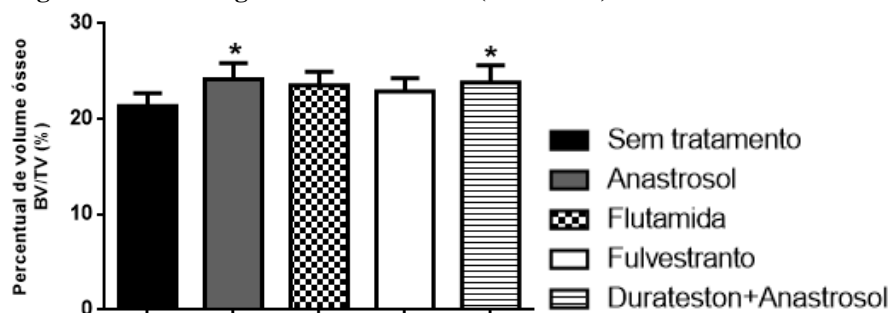
A) Médias do nível sérico de testosterona circulante (ng/mL) e B) Médias do peso corporal dos animais, no período inicial (dia 0) e 21 dias após o bloqueio dos receptores de andrógenos e estrógeno, e da enzima aromatase. * $p < 0.05$ comparado ao respectivo grupo no dia 0, # $p < 0.05$ comparado ao grupo durateston+anastrozol no dia 21, ## $p < 0.05$ em relação ao grupo flutamida no dia 21. Média (\pm DP).

Fonte: Elaboração própria.

O bloqueio da aromatase pelo anastrozol mantém maior volume de tecido ósseo

A porcentagem BV/TV observada no grupo sem tratamento foi menor comparativamente aos demais grupos, demonstrando que os tratamentos foram capazes de reduzir a reabsorção óssea. Apesar de similar entre os grupos tratados, o percentual de tecido ósseo foi estatisticamente maior nos grupos tratados com anastrozol e terapia hormonal mais anastrozol em relação ao grupo sem tratamento ($p < 0.05$) (Figuras 5 e 6).

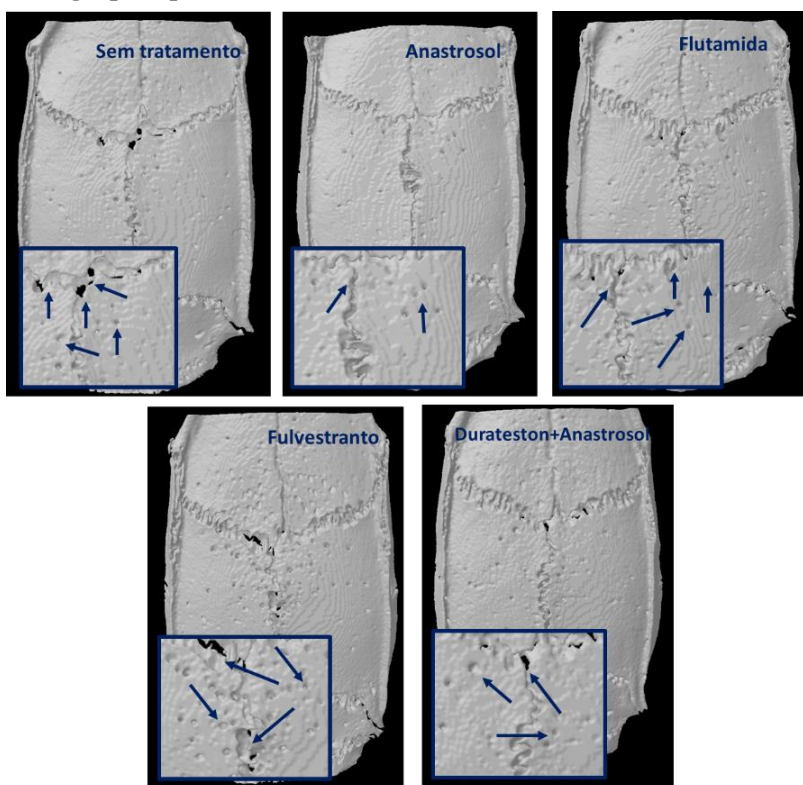
Figura 5 - Porcentagem de volume ósseo (% BV/TV) da calvária dos animais.



Análise por microtomografia computadorizada sugere que a administração de anastrozol previne a reabsorção óssea. * $p < 0.05$ comparado ao grupo sem tratamento. Média (\pm DP).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 6 – Imagens tridimensionais da calvária, representativas de cada grupo experimental.



Nos quadros em destaque, as setas apontam os pontos de reabsorção distribuídos na superfície da calvária, e a reabsorção óssea nas suturas.

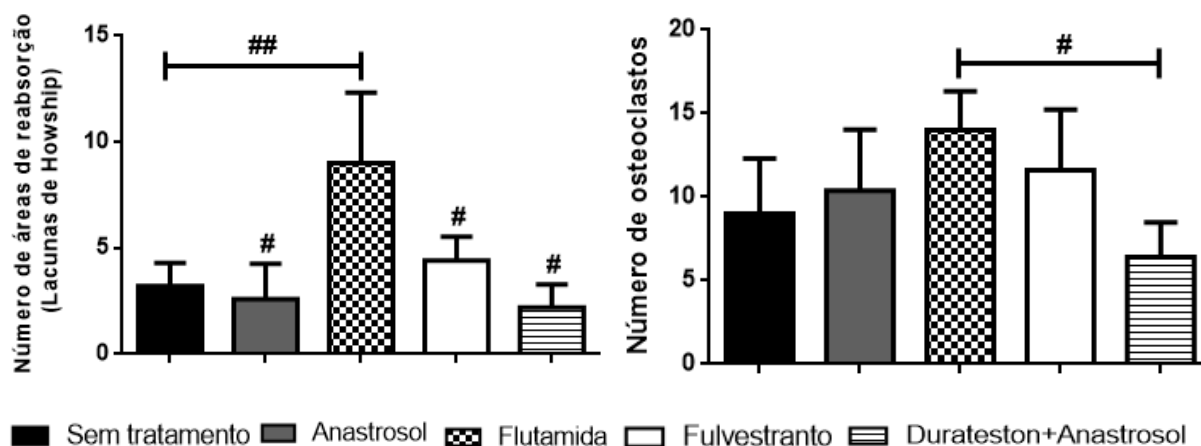
Fonte: Elaboração própria.

Bloqueio da ação de andrógenos está associado ao maior aumento de pontos de reabsorção na superfície da calvária

Os pontos de reabsorção na calvária foram aumentadas pelo tratamento com flutamida comparando-se ao grupo sem tratamento e demais grupos ($p < 0.05$), enquanto a administração de anastrozol, fulvestranto e durateston+anastrozol reduziu o número de lacunas de Howship

comparando-se ao grupo sem tratamento ($p>0.05$), principalmente nos grupos tratados com anastrozol (grupos ANA e DURA+ANA). O número de células osteoclásticas foi sutilmente maior no grupo FLUTA, porém manteve-se próximo aos demais grupos ($p>0.05$), exceto comparado ao grupo tratado com durateston e anastrozol que foi significativamente menor que naquele grupo ($p<0.05$) (Figuras 7 e 8).

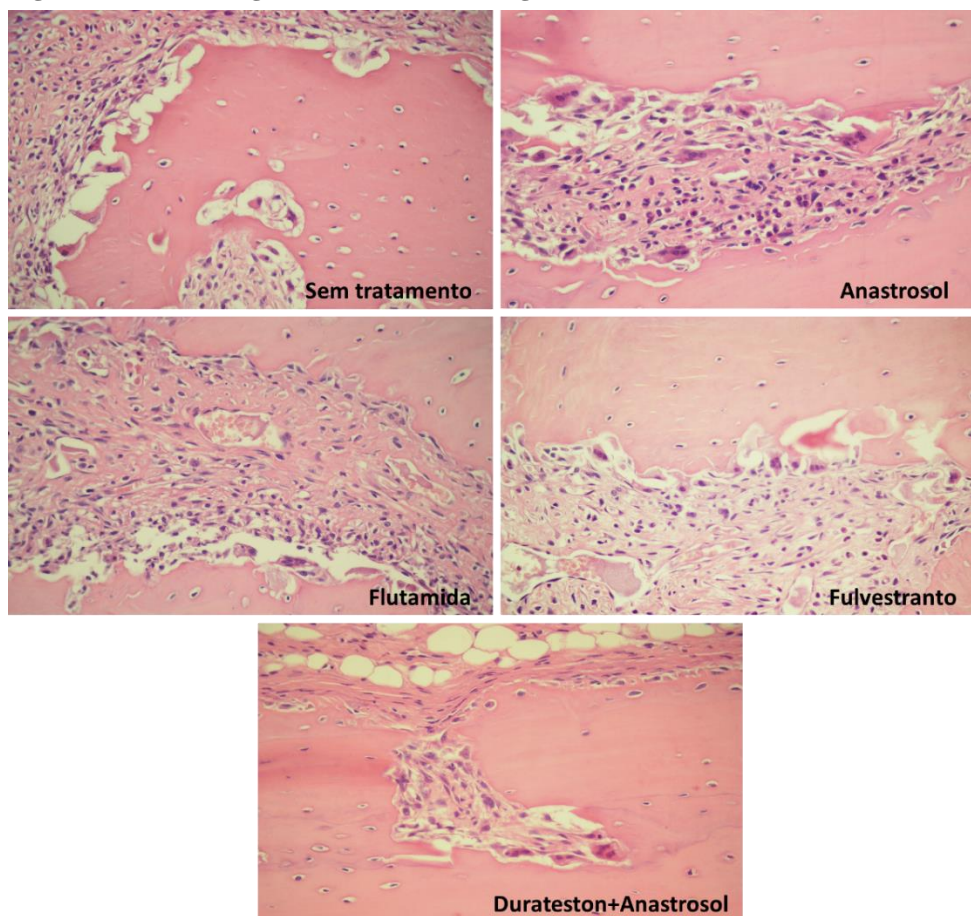
Figura 7 - Quantificação de osteoclastos e pontos de reabsorção/ lacunas de Howship.



O bloqueio de receptores de andrógenos, pela flutamida, promoveu aumento significativo do número pontos de reabsorção (Lacunas de Howship). # $p<0.05$ comparado ao grupo flutamida, ## $p<0.05$ comparado ao grupo sem tratamento. Média (\pm DP).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 8 – Fotomicrografias de cortes histológicos corados em H&E (40x).



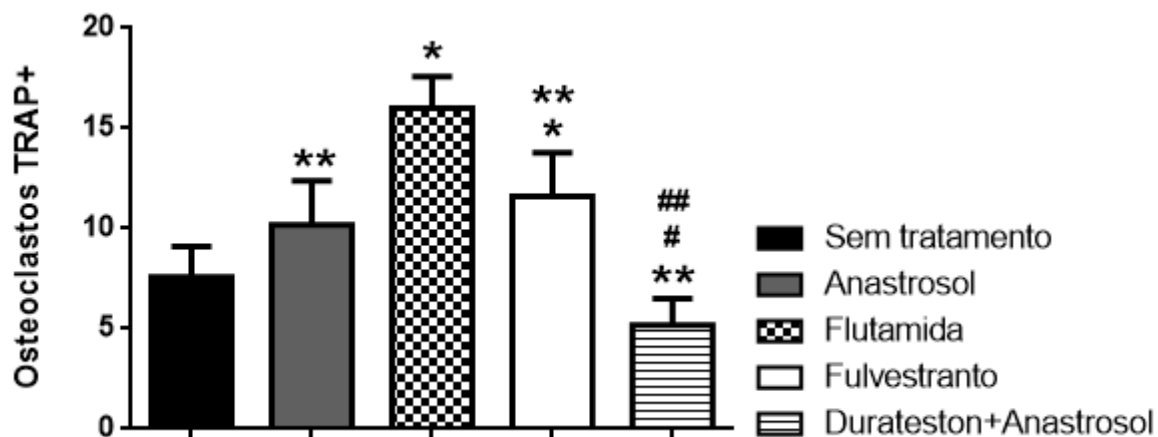
As imagens mostram o impacto do bloqueio dos receptores de andrógenos e estrógeno, e inibição da aromatase, sobre a perda óssea induzida por *P. gingivalis*. Pode-se observar lacunas de Howship e osteoclastos distribuídos na superfície do osso.

Fonte: Elaboração própria.

A atividade de osteoclastos é aumentada pelo bloqueio de receptores de andrógenos (flutamida)

O número de osteoclastos TRAP+ foi significativamente aumentado pelo tratamento com flutamida, quando comparado aos demais grupos ($p < 0.05$). O tratamento com durateston+anastrozol promoveu acentuada diminuição da atividade de osteoclastos, observada pelo reduzido número de células TRAP+ (Figuras 9 e 10).

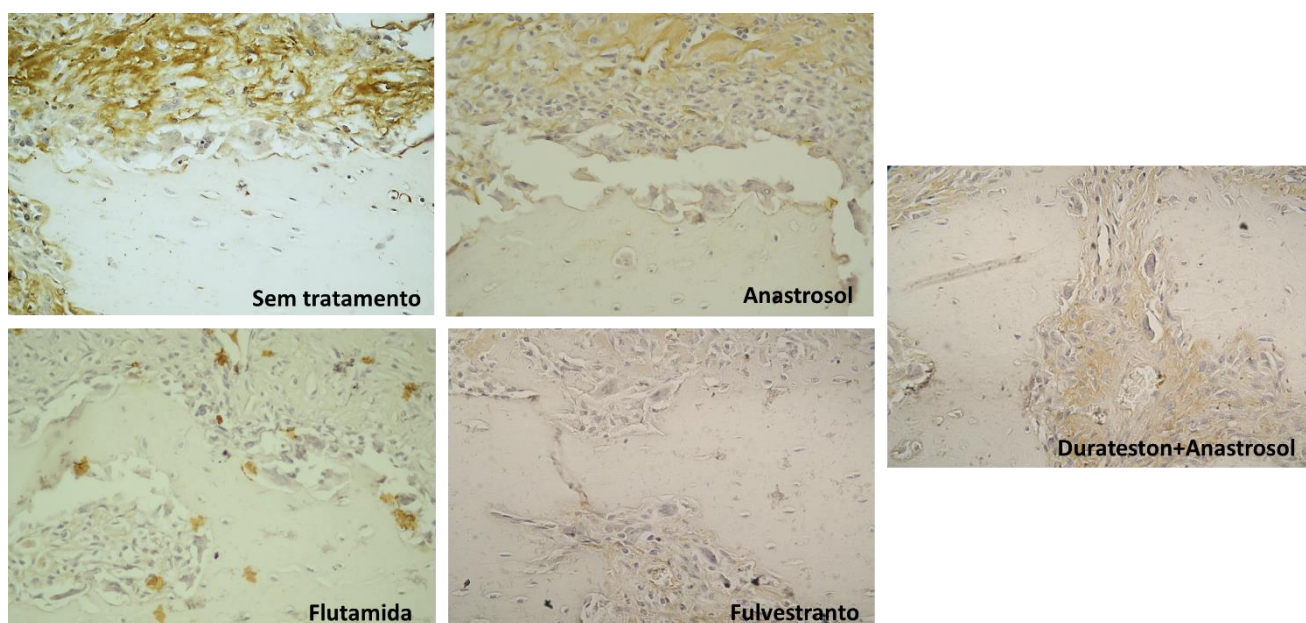
Figura 9 – Médias da quantificação de osteoclastos TRAP+.



O bloqueio dos receptores de andrógenos, pelo tratamento com flutamida, aumentou a atividade de osteoclastos. * $p < 0.05$ comparado ao grupo sem tratamento, ** $p < 0.05$ comparado ao grupo flutamida, # $p < 0.05$ comparado ao grupo fulvestranto, ## $p < 0.05$ comparado ao grupo anastrosol. Média (\pm DP).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 10 – Fotomicrografias de cortes corados por imunohistoquímica (40x).



Os cortes histológicos foram submetidos à reação de imunohistoquímica para avaliação de osteoclastos TRAP+. As células imunomarcadas são coradas em castanho-claro, próximas à superfície óssea.

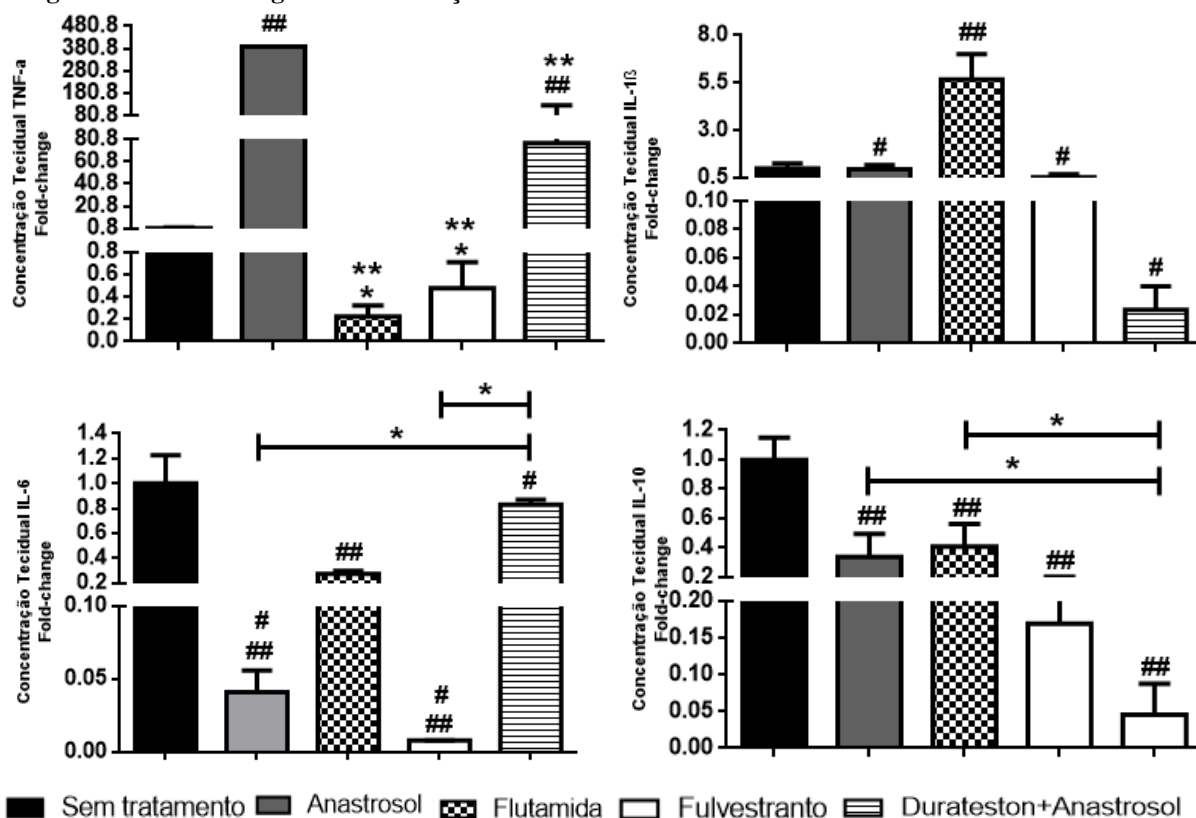
Fonte: Elaboração própria.

O bloqueio da atividade da aromatase e dos receptores de andrógeno e estrógeno modulam o processo inflamatório associado a perda óssea na calvária

Foram analisadas no tecido subcutâneo adjacente à calvária, as concentrações de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10, para avaliar o impacto do bloqueio dos receptores de andrógenos e estrógeno, além do bloqueio da enzima aromatase, na expressão de fatores pró-inflamatórios e anti-

inflamatórios teciduais, previamente detectados na presença de *P. gingivalis*. O bloqueio da enzima aromatase, pelo tratamento com anastrozol, elevou significativamente a expressão de TNF- α , reduziu IL-6 e IL-10 ($p < 0.05$), mantendo a concentração de IL-1 β próximo ao controle. O tratamento com flutamida reduziu a expressão de TNF- α , IL-6 e IL-10, e aumentou IL-1 β ($p < 0.05$); do mesmo modo, o bloqueio de receptores de estrógeno pelo fulvestranto reduziu a concentração de TNF- α , IL-6 e IL-10 ($p < 0.05$), mantendo IL-1 β a níveis próximos ao grupo sem tratamento. A expressão de IL-1 β e IL-10 foi acentuadamente reduzida pela administração de durateston associada ao anastrozol ($p < 0.05$), enquanto o nível tecidual de TNF- α foi elevado pelo mesmo tratamento ($p < 0.05$), e a expressão de IL-6 manteve-se próxima ao observado no grupo sem tratamento (Figura 11).

Figura 11 - Fold-change da concentração tecidual de citocinas inflamatórias.



* $p < 0.05$ comparado ao grupo durateston+anastrozol, ** $p < 0.05$ em relação ao grupo anastrozol, # $p < 0.05$ em relação ao grupo flutamida, ## $p < 0.05$ comparado ao grupo sem tratamento. Média (\pm DP).

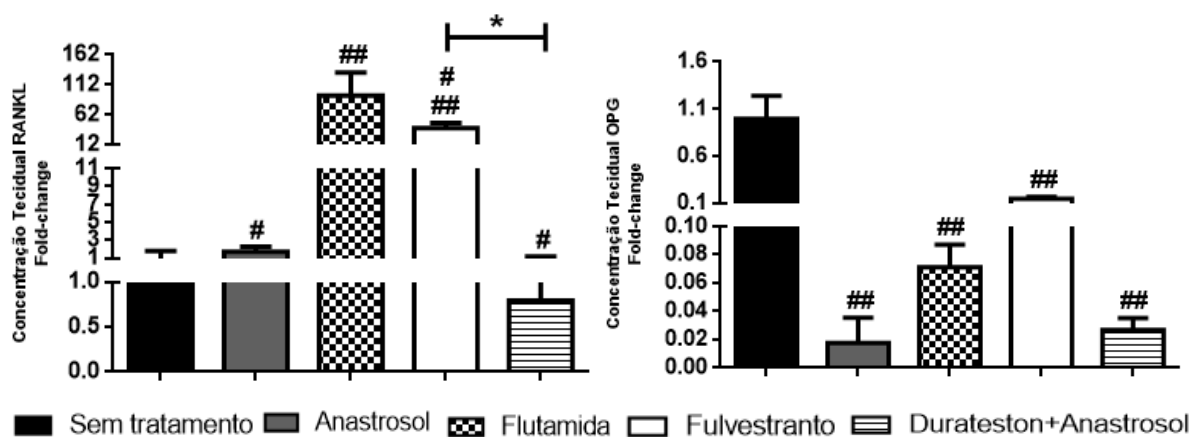
Fonte: Elaboração própria.

O bloqueio dos receptores de andrógenos e estrógeno elevam a produção de RANKL

Foi avaliado também o impacto do bloqueio de receptores de andrógenos e estrógenos, e o bloqueio da enzima aromatase, sobre a expressão de RANKL e OPG, previamente detectados na presença de *P. gingivalis*.

Os resultados demonstraram que o tratamento com anastrozol, associado ou não a administração de testosterona, promoveu significativa redução de OPG ($p < 0.05$) e manteve a expressão de RANKL próxima ao observado no grupo sem tratamento. Os tratamentos com flutamida e fulvestranto elevaram a concentração tecidual de RANKL e diminuíram o nível de OPG ($p < 0.05$) (Figura 12).

Figura 12 - Fold-change da concentração tecidual de RANKL e OPG.



* $p < 0.05$ comparado ao grupo durateston+anastrozol, # $p < 0.05$ em relação ao grupo flutamida, ## $p < 0.05$ comparado ao grupo sem tratamento. Média (\pm DP).

Fonte: Elaboração própria.

DISCUSSÃO

O modelo de reabsorção óssea em calvária de camundongos foi desenvolvido para estudar os efeitos de citocinas sobre a osteoclastogênese¹⁵, sendo posteriormente empregado para outras finalidades como, por exemplo, o efeito bacteriano sobre a reabsorção óssea^{16, 17, 18, 19, 20}. A inoculação de *P. gingivalis* viva sobre a calvária, estimula todos os eventos inflamatórios poucas horas após o primeiro estímulo bacteriano^{21, 20}, e a reabsorção óssea é diagnosticada entre 3 a 5 dias a partir do início da inoculação da *P. gingivalis*, dependendo da proporção do

estímulo^{20, 22}. O modelo vem sendo amplamente utilizado nas mais variadas investigações científicas, porém, sua utilização restringe-se a camundongos e não é relatada em ratos. Sendo assim, desenvolvemos o protocolo semelhante através da inoculação de *P. gingivalis* em calvária de ratos, para o estabelecimento e validação do mesmo método nessa espécie e, posteriormente, a realização do trabalho proposto. O delineamento experimental foi modificado a partir de considerações dos relatos de Graves et al.^{20, 21}, Suzuki et al.⁹ e Li et al.¹⁰. Os resultados da microCT, análise microscópica e estereométrica, confirmaram e validaram o protocolo. Verificou-se que o maior desafio bacteriano (1000 µL de 4x10⁹ UFC/mL), administrado em 3 momentos, resultou no desenvolvimento de resposta inflamatória, diferenciação de osteoclastos e consequente reabsorção óssea. O grupo de animais sem inoculação de *P. gingivalis* não apresentou reabsorção óssea, o que possibilitou a comparação e confirmação dos achados anteriores. Os animais que receberam uma única inoculação da bactéria e em baixa proporção (100 µL de 4x10⁹ UFC/mL), não apresentaram eventos inflamatórios e reabsorção óssea. Os resultados estão alinhados à observação de Graves et al.²⁰ que relataram que a baixa concentração bacteriana sobre a calvária é capaz de iniciar o evento inflamatório, porém sua resolução é rápida e relativamente com pequena destruição de tecido ósseo em camundongos.

A partir da validação do protocolo experimental objetivou-se avaliar o impacto do bloqueio de receptores de andrógenos/estrógeno e inibição da enzima aromatase sobre a reabsorção óssea induzida por *P. gingivalis* na calvária de ratos. Os protocolos farmacológicos para bloqueio dos receptores de andrógeno (flutamida), estrógeno (fulvestranto) e inibição da enzima aromatase (anastrozol), foram efetivos sobre os níveis séricos de testosterona. O emprego do anastrozol, associado ou não a administração de durateston, e a administração do fulvestranto foi estabelecido, respectivamente, com o propósito de inibir a conversão da testosterona em estrógeno e bloquear os receptores de estrógeno. Entretanto, não foi objetivo do trabalho

analisar os efeitos do estrógeno no modelo de reabsorção óssea, e sim permitir a avaliação isolada da testosterona sobre esse processo. Por outro lado, o bloqueio dos receptores de andrógenos pela flutamida inibe sua ativação pela testosterona e, conseqüentemente, permite suprimir a ação do hormônio no organismo. O aumento no nível sérico de testosterona verificado nos animais tratados com flutamida confirma, portanto, a ausência de atividade do hormônio sobre as células e tecidos, indicando um mecanismo de feedback, devido a inativação dos receptores de andrógenos, como sugerido por Steffens et al.⁸.

Avaliando-se os resultados por imagem e microscópico, especificamente do grupo sem tratamento, confirmamos a reprodutibilidade dos achados observados previamente no protocolo desenvolvido, evidenciando a presença de reabsorção óssea. Análise por microtomografia computadorizada sugere que a administração de anastrozol previne a perda óssea inflamatória. Cabe destacar que apenas os tratamentos com ANA e DURA+ANA promoveram significativa preservação do volume ósseo em relação ao grupo de animais sem tratamento e, tendência em apresentar maior quantidade de osso comparando-se aos grupos FLUTA e FULV. No trabalho de Beck et al.²³ os autores avaliaram o impacto do anastrozol associado ou não a administração de testosterona sobre a perda óssea em fêmur de ratos castrados, e observaram através de microtomografia que a porcentagem de volume ósseo foi acentuadamente preservado pela terapia com anastrozol+testosterona, enquanto apenas o anastrozol não foi capaz de prevenir a reabsorção óssea. Os autores sugeriram que a preservação de tecido ósseo ocorreu exclusivamente pela ação da testosterona, independentemente de sua aromatização. Contudo, em nosso trabalho atribuímos essa ação protetora contra a perda óssea, à não aromatização da testosterona pelo anastrozol, uma vez que no grupo sem tratamento o volume ósseo foi reduzido e acompanhado da aromatização do hormônio. Ainda, a concentração sérica de testosterona não diferiu nos grupos sem tratamento e ANA, o que nos permite também sugerir que o estrógeno parece desempenhar importante papel durante a perda óssea. Os tratamentos com flutamida

(bloqueio de receptores de andrógeno) e fulvestranto (bloqueio de receptores de estrógeno) não produziram efeitos significativos sobre o volume ósseo quando comparados aos demais grupos. Steffens et al.⁸ avaliaram o impacto da flutamida sobre a reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos, e mostraram através da análise de microtomografia que a droga não influencia a perda óssea comparando-se ao grupo de animais sem tratamento. De maneira semelhante, Melville et al.⁷ investigaram a associação do volume ósseo e a deleção de receptores de estrógeno em tíbia de ratos knockout para esses receptores, e verificaram também através de microtomografia tendência dos animais knockout em apresentar maior percentual de tecido ósseo em relação aos ratos do grupo controle. Esses dados apontam que o bloqueio de receptores de andrógenos e estrógenos não parecem desempenhar importante função sobre a perda óssea em ratos machos.

Em contrapartida aos dados da análise tridimensional, a análise microscópica e estereométrica não evidenciaram diferença significativa na perda óssea, quando os ratos foram tratados com ANA e DURA+ANA. Detectou-se significante aumento dessas alterações quando os ratos foram tratados com bloqueador de receptor de andrógenos (flutamida). A literatura relata que a bloqueio de receptores de andrógenos (RA) em camundongos resulta em elevado turnover ósseo, aumentando a reabsorção e reduzindo o volume ósseo cortical e trabecular, decorrente da diminuição da formação de tecido ósseo³ e, de maneira pertinente, outros estudos também mostram que a inativação de RA eleva a atividade de reabsorção óssea e inibe a mineralização do tecido ósseo^{4,5}.

É importante enfatizar que a reabsorção óssea induzida pela inoculação de *P. gingivalis* em calvária de ratos não ocorre de maneira uniforme e sim pontual, e a análise das estruturas por imagem podem sofrer limitações²⁴. Partindo-se desse pressuposto avaliou-se microscopicamente as mesmas peças, o que mostrou resultados mais amplos e de certa forma mais específicos. Foi realizada a quantificação de osteoclastos e mensurada a atividade dessas

células, avaliados respectivamente pela estereometria e análise de imunohistoquímica de células TRAP+. Os diferentes tratamentos não produziram efeitos significativos sobre o número de osteoclastos na superfície das calvárias, mantendo-se similar entre os grupos. Por outro lado, a marcação de células TRAP+ foi consideravelmente elevada pelos tratamentos com flutamida e fulvestranto, indicando o efeito estimulador dessas drogas sobre a atividade e não quantidade dessas células. O embasamento de nossos resultados a partir de informações da literatura é limitado, uma vez que não há trabalhos reproduzindo os mesmos protocolos que os do presente trabalho de forma comparativa e, mesmo relatos avaliando de maneira dissociada cada tratamento sobre modelo de reabsorção óssea são praticamente ausentes. Steffens et al.⁸ observaram que o bloqueio dos receptores de andrógenos, pela flutamida, não interfere na quantidade de osteoclastos em periodontite crônica induzida em ratos. Conforme observado no presente trabalho e analisando de forma comparativa aos resultados do impacto do bloqueio de receptores de estrógeno pelo fulvestranto, Melville et al.⁷ também verificaram em tibia de ratos knockout para receptores de estrógeno, elevado aumento no número de osteoclastos TRAP+. Avaliando-se o impacto do anastrozol associado ou não a administração de testosterona sobre a perda óssea em fêmur de ratos orquiectomizado, Beck et al.²³ verificaram que o número de osteoclastos sobre o tecido ósseo nos ratos tratados com anastrozol manteve-se elevado comparando-se aos animais controle, enquanto a administração de testosterona e anastrozol reduziu significativamente o número de osteoclastos. Esse dado é similar ao observado em nosso trabalho, indicando a influência da testosterona apenas, independente da inibição de sua aromatização, na redução da quantidade de osteoclastos. Apesar das limitações metodológicas, as informações corroboram com nossos resultados, e sugerem que bloqueio de receptores de andrógenos/estrógeno e inibição da conversão de testosterona, atuam sobre osteoclastos bem como sua atividade reabsortiva.

A resposta imunoinflamatória é importante moduladora do processo de reabsorção óssea. Citocinas inflamatórias como, por exemplo, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, além de outros biomarcadores como o receptor ativador do fator nuclear Kappa ligante (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) desempenham ações variadas sobre o tecido ósseo e células constituintes e, dessa maneira, estão implicadas na regulação do processo de reabsorção óssea^{8, 25, 26, 27}. Graves et al.²⁶ descrevem que a proporção elevada de RANKL/OPG favorece condições pró-reabsortivas, enquanto a redução dessa relação está relacionada a mecanismos anti-reabsortivos. Na patogênese da perda óssea periodontal estimulada por bactérias, Garlet et al.²⁸ relatam que há um aumento inicial na proporção RANKL/OPG e, após a perda óssea inicial há produção de fatores anti-reabsortivos como por exemplo as interleucinas 4 e 10 (IL-4 e IL-10), que em conjunto e associadas a outros fatores reduzem a razão RANKL/OPG.

No presente trabalho, o bloqueio dos receptores de andrógenos/estrógeno e inibição da aromatase atuam suprimindo IL-10. Sabe-se que IL-10 é uma citocina extremamente estudada e conhecida principalmente por seu papel regulador em diversos modelos de infecção e inflamação. Podemos aventar a hipótese que tanto o bloqueio de receptores de andrógenos/estrógeno quanto a inibição da enzima aromatase agem como pró-inflamatórios. Logicamente, estudos adicionais deverão ser realizados para confirmar ou não essa hipótese. Surpreendentemente o tratamento com as diferentes drogas também se correlacionaram com a baixa produção de IL-6, mas a flutamida atuou marcadamente na síntese de IL-1 β , RANKL, e redução da concentração de OPG, assim como o fulvestranto também atuou sobre RANKL e OPG, o que pode ser um caminho de investigação de sinalizações intracelulares envolvendo tais biomarcadores. Similar aos resultados pertinentes ao grupo flutamida, registros da literatura também relatam o aumento da produção de RANKL em camundongos knockout para receptores de andrógenos^{3, 29}, permitindo a comparação ao nosso trabalho, uma vez que também foi estabelecida a deleção dos receptores de andrógenos, porém através da flutamida. De modo

semelhante, a maior atividade dos osteoclastos estimulada pelo fulvestranto também pode estar associada ao aumento da produção de RANKL promovido pelo medicamento. Wang et al.³⁰ relataram em seu trabalho, que o tratamento in vitro com fulvestranto estimula a produção de RANKL a partir de osteoblastos. Em conjunto, os dados suportam a ideia de que a inativação de receptores de andrógenos e estrógeno estimulem a diferenciação e atividade de osteoclastos, principalmente pela ativação de RANKL, e favoreçam uma maior progressão da perda óssea. Esses efeitos foram atenuados pelo tratamento com anastrozol, que apesar de elevar a produção de TNF- α , manteve notavelmente baixa a concentração de RANKL aproximando-se do nível de OPG. Esse mecanismo refletiu na reduzida atividade de osteoclastos o que, sugestivamente, incorreu na preservação de maior percentual de volume ósseo e menor número de pontos de reabsorção. Comparativamente ao presente trabalho, Boutas et al.³¹ também relataram que a administração de anastrozol manteve reduzido os níveis de RANKL, em ratas ovariectomizadas.

CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que a flutamida e fulvestranto favoreceram a atividade de osteoclastos, principalmente através de RANKL, mas apenas a flutamida acentuou a reabsorção óssea.

REFERÊNCIAS

1. Siddiqui JA, Partridge NC. physiological bone remodeling: systemic regulation and growth factor involvement. *Physiology (Bethesda)*. 2016; 31(3):233-45.
2. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins patologia básica*. 9ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.
3. Kawano H, Sato T, Yamada T, Matsumoto T, Sekine K, Watanabe T, et al. Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(16): 9416-21.
4. Notini AJ, McManus JF, Moore A, Bouxsein M, Jimenez M, Chiu WS, et al. Osteoblast deletion of exon 3 of the androgen receptor gene results in trabecular bone loss in adult male mice. *J Bone Miner Res*. 2007; 22(3): 347-56.

5. Chiang C, Chiu M, Moore AJ, Anderson PH, Ghasem-Zadeh A, McManus JF et al. Mineralization and bone resorption are regulated by the androgen receptor in male mice. *J Bone Miner Res.* 2009; 24(4): 621-31.
6. Windahl SH, Börjesson AE, Farman HH, Engdahl C, Movérare-Skrtic S, Sjögren K. Estrogen receptor- α in osteocytes is important for trabecular bone formation in male mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110(6): 2294-9.
7. Melville KM, Kelly NH, Surita G, Buchalter DB, Schimenti JC, Main RP, et al. Effects of Deletion of ER α in Osteoblast-Lineage Cells on Bone Mass and Adaptation to Mechanical Loading Differ in Female and Male Mice. *J Bone Miner Res.* 2015; 30(8): 1468-80.
8. Steffens JP, Coimbra LS, Rossa C Jr, Kantarci A, Van Dyke TE, Spolidorio LC. Androgen receptors and experimental bone loss – an in vivo and in vitro study. *Bone.* 2015; 81: 683-90.
9. Suzuki Y, Aoki K, Saito H, Umeda M, Nitta H, Baron R, et al. A tumor necrosis factor-alpha antagonist inhibits inflammatory bone resorption induced by *Porphyromonas gingivalis* infection in mice. *J Periodontal Res.* 2006; 41(2): 81-91.
10. Li ZF, Cao LH, Wang Y, Zhang Z, Fan MW, Xu QA. Inhibitory effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammation and bone resorption in vivo. *Arch Oral Biol.* 2016; 72: 146-56.
11. Kurling-Kailanto S, Kankaanpää A, Hautaniemi J, Seppälä T. Blockade of androgen or estrogen receptors reduces nandrolone's ability to modulate acute reward-related neurochemical effects of amphetamine in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010; 95(4): 422-7.
12. Moussa L, Bézirard V, Salvador-Cartier C, Bacquié V, Houdeau E, Théodorou V. A new soy germ fermented ingredient displays estrogenic and protease inhibitor activities able to prevent irritable bowel syndrome-like symptoms in stressed female rats. *Clin Nutr.* 2013; 32(1): 51-8.
13. Vekariya KK, Kaur J, Tikoo K. Alleviating anastrozole induced bone toxicity by selenium nanoparticles in SD rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013; 268(2): 212-20.
14. Steffens JP, Coimbra LS, Ramalho-Lucas PD, Rossa C Jr, Spolidorio LC. The effect of supra- and subphysiologic testosterone levels on ligature-induced bone loss in rats – a radiographic and histologic pilot study. *J Periodontol.* 2012; 83(11): 1432-9.
15. Boyce B, Aufdemorte T, Garrett I, Yates A, Mundy G. Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice. *Endocrinology.* 1989; 125(3): 1142-50.
16. Zubery Y, Dunstan C, Story B, Kesavalu L, Ebersole J, Holt S, et al. Bone resorption caused by three periodontal pathogens in vivo in mice is mediated in part by prostaglandin. *Infect Immun.* 1998; 66(9): 4158-62.

17. Graves D, Oskoui M, Volejnikova S, Naguib G, Cai S, Desta T, et al. Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment, and osteoclast formation in response to *P. gingivalis* infection. *J Dent Res*. 2001; 80(10): 1875-9.
18. Leone CW, Bokhadhor H, Kuo D, Desta T, Yang J, Siqueira MF, et al. Immunization enhances inflammation and tissue destruction in response to *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 2006; 74(4): 2286-92.
19. Maitra R, Follenzi A, Yaghoobian A, Montagna C, Merlin S, Cannizzo ES, et al. Dendritic cell-mediated in vivo bone resorption. *J Immunol*. 2010; 185(3): 1485-91.
20. Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C Jr. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Front Oral Biol*. 2012; 15: 117-32.
21. Graves D, Naguib G, Lu H, Desta T, Amar S. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae are proinflammatory but do not play a prominent role in the innate immune response to *P. gingivalis*. *J Endotoxin Res*. 2005; 11(1): 13-8.
22. He H, Liu R, Desta T, Leone C, Gerstenfeld L, Graves D. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology*. 2004; 145(1): 447-52.
23. Beck DT, Yarrow JF, Beggs LA, Otzel DM, Ye F, Conover CF, et al. Influence of aromatase inhibition on the bone-protective effects of testosterone. *J Bone Miner Res*. 2014; 29(11): 2405-13.
24. Draenert ME, Draenert AI, Forriol F, Cerler M, Kunzelmann KH, Hickel R, et al. Value and limits of μ -CT for nondemineralized bone tissue processing. *Microsc Res Tech*. 2012; 75(4): 416-24.
25. Nelson CA, Warren JT, Wang MW, Teitelbaum SL, Fremont DH. RANKL employs distinct binding modes to engage RANK and the osteoprotegerin decoy receptor. *Structure* 2012; 20(11): 1971-82.
26. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*. 2011; 3: 21547019.
27. Steffens JP, Herrera BS, Coimbra LS, Stephens DN, Rossa C Jr, Spolidorio LC, et al. Testosterone regulates bone response to inflammation. *Horm Metab Res*. 2014; 46(3): 193-200.
28. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol*. 2006; 21(1): 12-20.
29. Yeh S, Tsai MY, Xu Q, Mu XM, Lardy H, Huang KE, et al. Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*.; 2002; 99(21): 13498-503.

30. Wang QP, Yang L, Li XP, Xie H, Liao EY, Wang M, Luo XH. Effects of 17β -estradiol on adiponectin regulation of the expression of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand. *Bone*. 2012; 51(3): 515-23.
31. Boutas I, Pergialiotis V, Salakos N, Korou LM, Mitousoudis A, Kalampokas E, et al. Assessment of bone metabolism and biomechanical properties of the femur, following treatment with anastrozole and letrozole in an experimental model of menopause. *Oncol Lett*. 2017; 14(3): 3494-502.

4.5 Publicação 5

Long-term testosterone depletion attenuates inflammatory bone resorption in the ligature-induced periodontal disease model^{*}

Vinícius de Paiva Gonçalves (DDS, MSc)^{*}, Adriana Alicia C. Ortega (DDS, MSc)^{*}, João Paulo Steffens (DDS, PhD)[†], Denise Madalena Palomari Spolidorio (DDS, PhD)[‡], Carlos Rossa Junior (DDS, PhD)^{*}, Luis C. Spolidorio (DDS, PhD)[‡].

^{*} Department of Diagnosis and Surgery, Araraquara School of Dentistry, University of São Paulo State, UNESP, Araraquara, SP, Brazil

[†] Department of Stomatology, Federal University of Paraná, UFPR, Curitiba, PR, Brazil.

[‡] Department of Physiology and Pathology, Araraquara School of Dentistry, University of São Paulo State, UNESP, Araraquara, SP, Brazil

Corresponding author and address for correspondence: Luis Carlos Spolidorio, DDS, PhD. Department of Physiology and Pathology – Araraquara School of Dentistry – University of São Paulo State (UNESP). St. Humaitá, 1680 – Center 14801-903, Araraquara – SP, Brazil. Tel: +55 (16) 3301-6479, Fax: +55 (16) 3301-6488 – lspolidorio@gmail.com

Words count – 4.000

Figures number – 6

References number- 42

Running title: Testosterone depletion attenuates periodontal bone loss

Sentence summary: Orchiectomy reduces periodontal bone loss associated with ligature-induced periodontitis in rats and promotes decreased production of gingival IL-1 β

^{*} *Artigo aceito para publicação na revista Journal of Periodontology em 28/09/2017*
JOP – 17 – 0457.R1 (Autorização - Anexo E)

Abstract

Background: Testosterone is known to affect bone in physiological and pathological conditions. The purpose of this study is to evaluate the role of testosterone in experimental periodontal disease in rats.

Methods: In this study we used a ligature model of periodontal disease in rats submitted to orchietomy (OCX, testosterone depletion) with and without testosterone replacement therapy (TR). Control animals were sham-operated and retained physiological testosterone levels. Sixty-two days after orchietomy and sham operations, ligatures were placed around the lower first molars for 2 weeks to induce experimental periodontal disease. Negative control animals received no ligatures. The outcomes assessed in the periodontal tissues were: inflammatory cytokine expression by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), stereometric analysis of the inflammatory process and quantitation of inflammatory bone resorption by microcomputed tomography (μ CT).

Results: The OCX+TR group showed the greatest increase in fibroblastic cells and blood vessels with reduced inflammatory cell numbers in the gingival tissue with induction of periodontal disease. There were no significant differences between OCX and Sham-operated groups in all the stereometric parameters assessed. Ligature placement induced inflammatory bone resorption, which was significantly attenuated in OCX animals. Experimental periodontitis induced a significant increase in Interleukin (IL)-1 β , but the lowest levels were observed in the periodontitis/OCX group. IL-6 levels were not affected by OCX, but were significantly reduced in OCX+TR animals.

Conclusion: The findings of the present study suggest that testosterone depletion attenuates inflammatory bone resorption in ligature-induced periodontitis, which may be partly mediated via decreased production of IL-1 β .

Keywords: Periodontitis, Inflammation, Testosterone

Introduction

Chronic periodontitis is a multifactorial inflammatory disease that affects supporting structures of the teeth¹, initiated by immune response against a group of microorganisms in susceptible hosts². The hallmark characteristic of chronic periodontitis is inflammatory resorption of alveolar bone and the global prevalence of the severe form is high (~10%)^{3,4}. There is convincing evidence that hormonal fluctuations affect periodontal disease, particularly for diabetes⁵ and variations in female steroid hormones^{6,7}. Interestingly, in spite of greater incidence and severity of destructive periodontal disease in males^{5,8}, there is a relative scarcity of information regarding the effect of androgens on the disease process.


Periodontitis is characterized by an overproduction of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)⁹. These mediators indirectly mediate degradation of non-mineralized and mineralized tissue degradation by inducing the production of matrix metalloproteases and osteoclast-inducing and activating receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), resulting in the resorption of the alveolar bone¹⁰. In this context, steroid hormones, including sex hormones, are potent modulators of inflammation and bone turnover^{11,12}. Testosterone has an immunosuppressive effect, as indicated by the decrease of macrophage and lymphocyte T helper (CD4+ T) cell infiltration in experimental autoimmune orchitis in rats, and these effects were associated with reduced production of pro-inflammatory mediators monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), TNF, IL-6 and IFN- in the draining lymph nodes¹³. Moreover, in vitro, treatment of naïve T cells with testosterone expanded the suppressive T regulatory subset¹². Production of IL-1 β and TNF by human macrophages in response to oxidized low-density lipoproteins was also reduced by testosterone¹⁴; whereas in murine macrophages testosterone downregulated lipopolysaccharide (LPS)-induced activation of protooncogen c-FOS, p38 mitogen-activated protein kinases (p38 MAPK) and reduced the production of nitric oxide synthase (NOS)¹⁵. On the other hand, testosterone enhanced LPS-induced IL-6 and MCP-1 production in adipocytes via enhanced activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK)1/2 and factor nuclear kappa B (NF-kB) signaling¹⁶. Nevertheless, the role of testosterone in modulating host-microbial interactions in vivo is largely unknown.

Our research group has shown the complexity of biological responses associated with both decrease and increase of testosterone levels in the experimental periodontal disease model^{17,18,19}. Short-term reduction of testosterone levels in young animals caused an increase of inflammatory bone resorption and osteoclast numbers with a corresponding increase in locally-produced IL-1 β in vivo; whereas in vitro testosterone suppressed RANKL-induced osteoclastogenesis¹⁷. Interestingly, increased levels of testosterone also caused a slight, but significant, increase in alveolar bone resorption in the absence of inflammation, which suggests differential effects of testosterone in inflammatory bone resorption and physiological bone remodeling¹⁸. In contrast with previous studies^{17,18,19}, the present investigation assesses the effect of long-term depletion of testosterone on the bone resorption and inflammation associated with the ligature model of experimental disease in rats. Moreover, we used aged rats, which respond differently than younger animals^{20,21}. This makes this experimental approach more representative of the changes in age-associated hormone deficiency in humans. Long-term changes associated with low testosterone levels allow for the occurrence of structural changes in bone tissue associated with physiological bone remodeling and also of basal changes in the immune cells that may respond differently to the bacterial stimuli.

Material and methods

Animals

All experimental protocols were approved by the Ethics in Animal Usage Committee of the School of Dentistry at Araraquara-UNESP (Process CEUA/FOAr #20/2016). Sixty male rats (*Rattus norvegicus albinus*, Holtzman lineage), 11-12 months old, were randomly distributed into 6 groups (n = 10/group), maintained at a temperature of 21°C \pm 1, humidity of 65-75% and a controlled light cycle (12 h light-12 h dark), with standard rat chow and water available *ad libitum*. The experimental groups and conditions are shown in Figure 1.



Groups (n=10)	Surgery	1st Testosterone replacement	2nd Testosterone replacement	Ligature	Euthanasia
G1	SHAM	NO	NO	NO	YES
G2	SHAM	NO	NO	YES	YES
G3	OCX	NO	NO	NO	YES
G4	OCX	NO	NO	YES	YES
G5	OCX	YES	YES	NO	YES
G6	OCX	YES	YES	YES	YES

Figure 1- Distribution of experimental groups and procedures. SHAM-operated= no removal of testicles; OCX= orchiectomy.

Orchiectomy

Briefly, 40 rats (n=10/group) received a scrotal incision for bilateral testicular removal and the incision was sutured under anesthesia using ketamine* (1 mL/kg) and xylazine† (0.4 mL/kg) under sterile conditions. The rats received ketoflex‡ (0.03 ml/rat, intramuscular) for postoperative pain relief and a combination of benzylpenicillin and streptomycin salts (Pentabiótico§/0.2 ml/rat, intramuscular). The sham procedure, was performed in 20 rats (n=10/group) including the surgical exposure and manipulation of the testicles (without the actual dissection and removal) and suturing. After the procedure, the animals were kept in separate cages for recovery during one week (Figure 1).

Hormone Replacement with Testosterone

Thirty days after surgery, 20 rats (n=10/group) received 62.5 mg/kg of body weight of testosterone undecanoate (Nebido||) intramuscularly. At day 60 (thirty days after the first testosterone injection) a second hormonal therapy was performed following the same procedure in order to maintain physiological levels of testosterone until end of the experimental period²² (Figure 1).

*Ceva Animal Health, Paulínia, Brazil.

†Ceva Animal Health, Paulínia, Brazil.

‡MERIAL, Campinas, Brazil.

§Zoetis, São Paulo, Brazil.

|| Bayer, Socorro, Brazil.

Induction of experimental periodontal bone loss

Sixty-two days after orchietomy (or sham surgery), 30 rats (n = 10/group) were anesthetized as described above. A 3.0 cotton ligature was placed bilaterally in a sub-gingival position around the lower first molars to enable bacterial accumulation, leading to inflammation and bone loss. The other 30 animals did not receive ligatures and served as healthy controls. The ligatures were maintained for 15 days, at which time all rats were euthanized (Figure 1).

Assessment of testosterone

A blood sample was collected from every animal at the beginning of the experiment, before the surgical procedure (baseline), and 3 days post-orchietomy/sham operation. A second and third caudal blood collections were performed for all animals 25 days after the 1st testosterone replacement (TR) and repeated 48 hours after the 2nd TR. A final blood collection to assess testosterone levels was performed by cardiac puncture at sacrifice. Each serum sample was analyzed for total testosterone levels using a chemiluminescence-based immunoassay (Immulite 2000[†]).

Euthanasia and tissue sample collection

After completing the experimental periods, all rats were euthanized by overdose of anesthesia and the samples collected. The mucogingival tissues around the lower first molars of the hemi-mandible in 10 animals per group were removed, immediately snap frozen in liquid nitrogen and kept at - 80°C until analysis. The remaining hemi-mandibles were fixed in 10% buffered formalin (pH 7.2) for 48 h and transferred to 70% ethanol.

Stereometry

The specimens were submitted to routine processing (including decalcification in 0.5 M Ethylenediamine tetraacetic acid-EDTA, pH 7.2 for 6 weeks) and embedded in paraffin in a standardized spatial orientation to obtain 5 µm thick semi-serial longitudinal sections on the bucco-lingual or frontal

[†] Siemens Healthcare Diagnostics, Gwynedd, United Kingdom.

plane. The sections were mounted on glass slides and routinely stained with Hematoxylin and Eosin (H&E). A 32.400 μm^2 grid with 9×4 squares of 30 μm was constructed using an image managing/editor software (Adobe Photoshop CS5) and overlaid on the digital images obtained from the histological sections. The region of interest for the analysis was represented by the whole grid, which was positioned in a submarginal area of the buccal and lingual surfaces, representing the connective tissue subjacent to the gingival sulcus (the apical border of the junctional epithelium and tooth structure were used as upper and lateral limits of the grid, respectively). A single examiner (LCS), who was previously trained and calibrated, performed the stereometric analysis using a point-counting technique. The following structures observed on each intersection point of the grid were recorded: inflammatory cells, fibroblasts, extracellular matrix and blood vessels, counted using a histological section of the hemi-mandibles of 5 animals/group. For each specimen, the values obtained from the measurements from each surface were combined and averages and standard deviations were calculated. The presence of each structure was expressed as a percentage of the total area analyzed²³.

Micro-computed tomography (μCT)

The hemi-mandibles of 5 animals/group were scanned in the microcomputed tomography (μCT) using microfocus x-ray CT system. The specimens were scanned at a resolution of 18 μm , 50kV, 500 μA using a 0.5 mm aluminum attenuation filter. CTan/CTvol software was used for imaging, reconstruction, re-orientation of reconstructed tridimensional images and analysis. In each sample, a standardized region of interest (ROI) was designed between the roots of the first molar, considering proximal bone tissue between 1st and 2nd molars to the mesial of the 1st molar and vestibular/lingual faces, in a slice-based method. In this standardized ROI the bone volume fraction was determined, using a standardized threshold to distinguish mineralized and non-mineralized tissues. The percentage of mineralized tissue corresponding to the root structures were subtracted from the bone volume fraction. The fraction bone volume/total volume (BV/TV) of the ROI was obtained and the resulting percentage is directly proportional to the extent of inflammatory bone resorption.

Expression of cytokines in the gingival tissue (ELISA)

Total protein was extracted from the gingival tissue samples using a commercially available lysis buffer (T-Per)* supplemented with a cocktail of protease inhibitors†. These tissue lysates were used for quantification of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits‡. Total protein concentration in each sample was determined using the Lowry method and used for normalization of the ELISA results. Data is expressed as fold-change relative to the concentrations of each cytokine in the control group samples.

Data analysis

Data was tested for homogeneity of variance and normal distribution using Kolmogorov-Smirnov test. One-way ANOVA and post-hoc Tukey tests were performed for pairwise comparison among all groups, and t tests to compare a ligated group in a given experimental condition with the respective non-ligated group in the same experimental condition. All analyses were performed using the statistical software GraphPad Prism 6¶. All tests were applied with a confidence level of 95% ($p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SD.

Results

Changes in testosterone serum levels

OCX decreased testosterone levels below the detection level (0.025 ± 0.005 ng/mL; $p < 0.05$ vs sham-control), whereas testosterone replacement (OCX+TR) resulted in a significant ($p < 0.05$) increase in the hormone concentration (3.52 ± 1.07 ng/mL) when compared with sham-control animals (1.16 ± 0.38 ng/mL) (Figure 2A). Although statistically significant, the magnitude of the increase in

* Pierce Biotechnology, Thermo-Fisher Scientific, Rockford, USA.

† Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

‡ R&D Systems, Minneapolis, USA.

¶ GraphPad Software Incorporated, San Diego, USA.

serum concentration of testosterone in the OCX+TR group was small and hormonal levels remained near-physiological level until the end of the experimental period (Figure 2B).

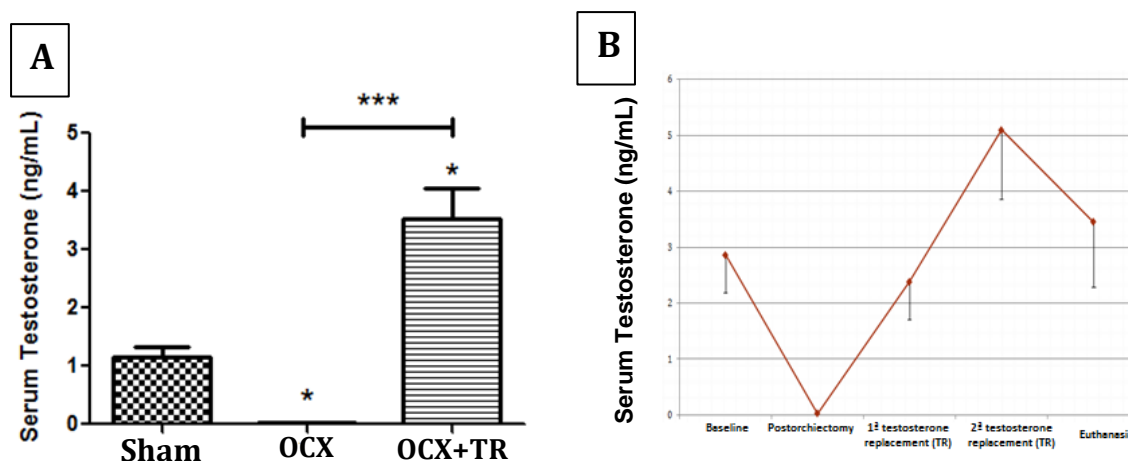


Figure 2- **A)** Serum concentration of testosterone (ng/mL) at the end of the experimental period in each experimental group; Bars represent means and vertical lines standard deviations. **B)** Serum levels of testosterone (ng/mL) at baseline, 3 days post-orchietomy, 25 days post-1st testosterone replacement, 48h post-2nd testosterone replacement and at euthanasia. *p<0.05 when compared to the SHAM group, ***p<0.05. Sham- hormonal competent control; OCX- Orchietomy; OCX+TR- Orchietomy+Testosterone replacement.

Gingival inflammation associated with ligature-induced periodontitis is not affected by OCX

The presence of a cotton ligature in a sub-marginal position around the lower first molars induced inflammation and alveolar bone resorption, which are the hallmarks of periodontitis, which is not observed in control rats. In the H&E-stained sections, periodontitis was characterized by intense infiltration by inflammatory cells, increased number and diameter of blood vessels, loss of connective tissue attachment, and alveolar bone resorption. This finding was also supported by stereometric analysis. In agreement with histological observations, control animals of the OCX+TR experimental group also presented a significant increase in fibroblastic cells and blood vessels in comparison with the sham-operated and OCX groups ($p<0.05$), suggesting an influence of TR on the physiological turnover of the gingival tissue. Ligature placement increased the number of inflammatory cells in the gingival tissue in both Sham-operated and OCX groups, but not in the OCX+TR group. Interestingly, the OCX+TR group also showed the greatest increase in fibroblastic cells and blood vessels in the gingival tissue in animals with ligatures ($p<0.05$). Consistent with the attenuation of inflammation in the OCX+TR group with disease induction, the reduction in extracellular matrix content associated with periodontal disease was notably less pronounced in comparison with the other experimental groups.

Overall, there were no significant differences between OCX and Sham-operated groups in all the stereometric parameters assessed. (Figures 3 and 4)

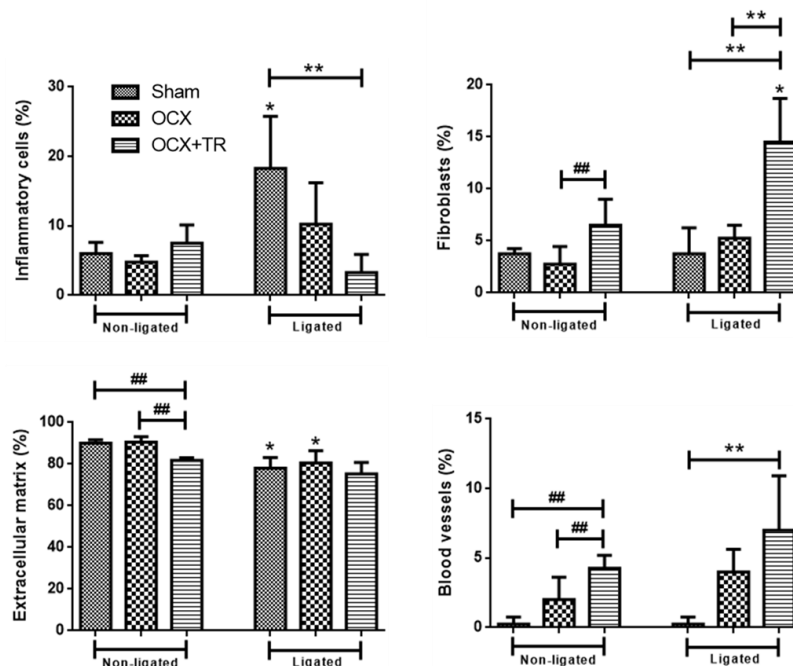


Figure 3- Stereometric analysis indicates that ligature is associated with a sustained inflammatory reaction. Inflammation was assessed by the relative presence of inflammatory cells, blood vessels, fibroblasts and extracellular matrix in 32,400 μm^2 area. * $p < 0.05$ when compared to the reference group non-ligated (one sample t test, assuming independence among the groups); ## and ** $p < 0.05$ (ANOVA, post-hoc Tukey) indicates the differences among the experimental groups according to the absence (non-ligated) or presence (ligated) of experimental periodontal disease, respectively. Sham- hormonal competent control; OCX- Orchiectomy; OCX+TR- Orchiectomy+Testosterone replacement.

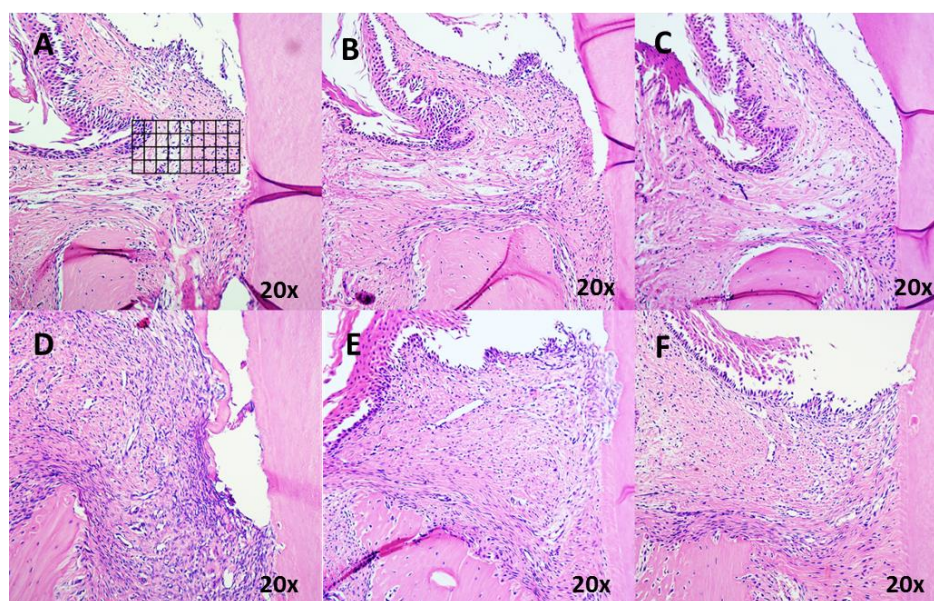


Figure 4- Photomicrographs illustrating histological sections of each experimental group are shown. The image A represent the placement of the 32,400 μm^2 grid on the submarginal area limited coronally by the apical border of the junctional epithelium and laterally by the tooth structure. Non-ligated groups (A-Sham / B-OCX / C-OCX+TR); Ligated groups (D-Sham / E-OCX / F-OCX+TR). Sham- hormonal competent control; OCX- Orchiectomy; OCX+TR- Orchiectomy+Testosterone replacement. (H&E staining)

Orchiectomy attenuates inflammatory bone resorption

μ CT analysis showed that ligature-induced periodontitis caused significant bone resorption, observed as a reduced BV/TV percentage, in all groups when compared to non-ligated animals with the same hormonal condition ($p < 0.05$). Inflammatory bone resorption was significantly ($p < 0.05$) attenuated in the OCX group compared with the OCX+TR group (Figures 5A and B).

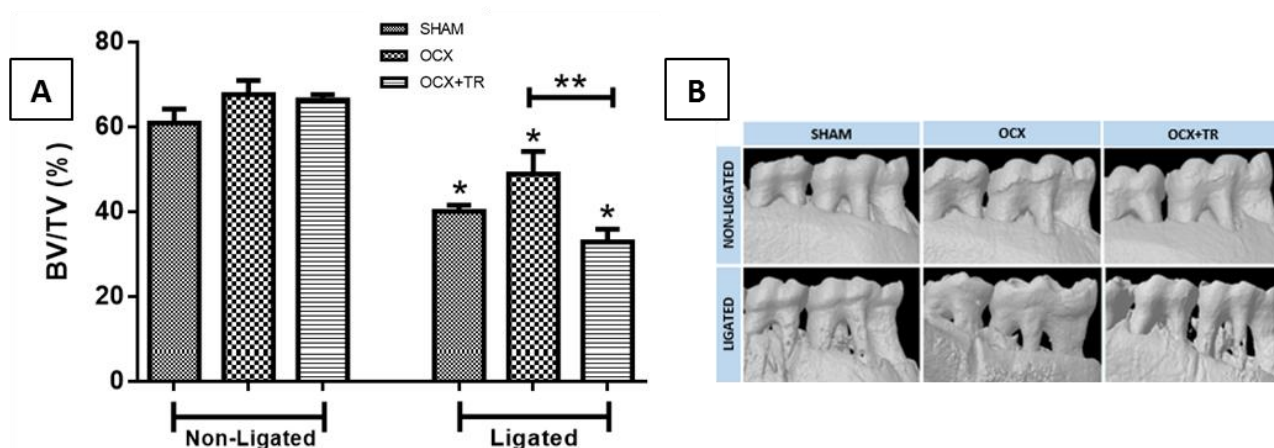


Figure 5- A) Bone volume fraction (BV/TV) in the standardized ROI assessed by μ CT at the end of the experimental period according to the presence of ligature-induced periodontal disease (ligated vs non-ligated) and experimental group (Sham- hormonal competent control; OCX- Orchiectomy; OCX+TR- Orchiectomy+Testosterone replacement). Bars represent mean and vertical lines the standard deviation of 10 animals/group B) Representative tridimensional images reconstructed from the μ CT scans of each experimental group. * $p < 0.05$ (unpaired t test) when compared with the same hormonal condition but without experimental periodontal disease (non-ligated). ** $p < 0.05$ (ANOVA, post-hoc Tukey) for the comparison among the hormonal conditions in the animals subjected to experimental periodontal disease (ligated group).

Variations in testosterone levels decrease the expression of selected inflammatory cytokines

In non-ligated animals, both the depletion of testosterone (OCX) and the slight increase in testosterone (OCX+TR) reduced the levels of all cytokines, except for IL-6 in the OCX+TR group when compared with the sham-control, hormone competent group ($p < 0.05$). In the presence of inflammation associated with experimental periodontitis, depletion of testosterone in the OCX group significantly reduced the levels of all cytokines, except for IL-6. Interestingly, testosterone replacement (OCX+TR) also significantly reduced the levels of all cytokines, with the exception of IL-1 β in comparison with the hormone-competent sham-control animals. Moreover, in ligated animals, testosterone replacement (OCX+TR) rescued the local IL-1 β production that was reduced in the OCX group to levels similar to those of the sham-control animals. Also, the slight (no statistically significant) increase in local IL-6 production observed in OCX animals was reduced by testosterone replacement (OCX+TR) to levels even lower than those of the sham-control animals (Figure 6A and B).

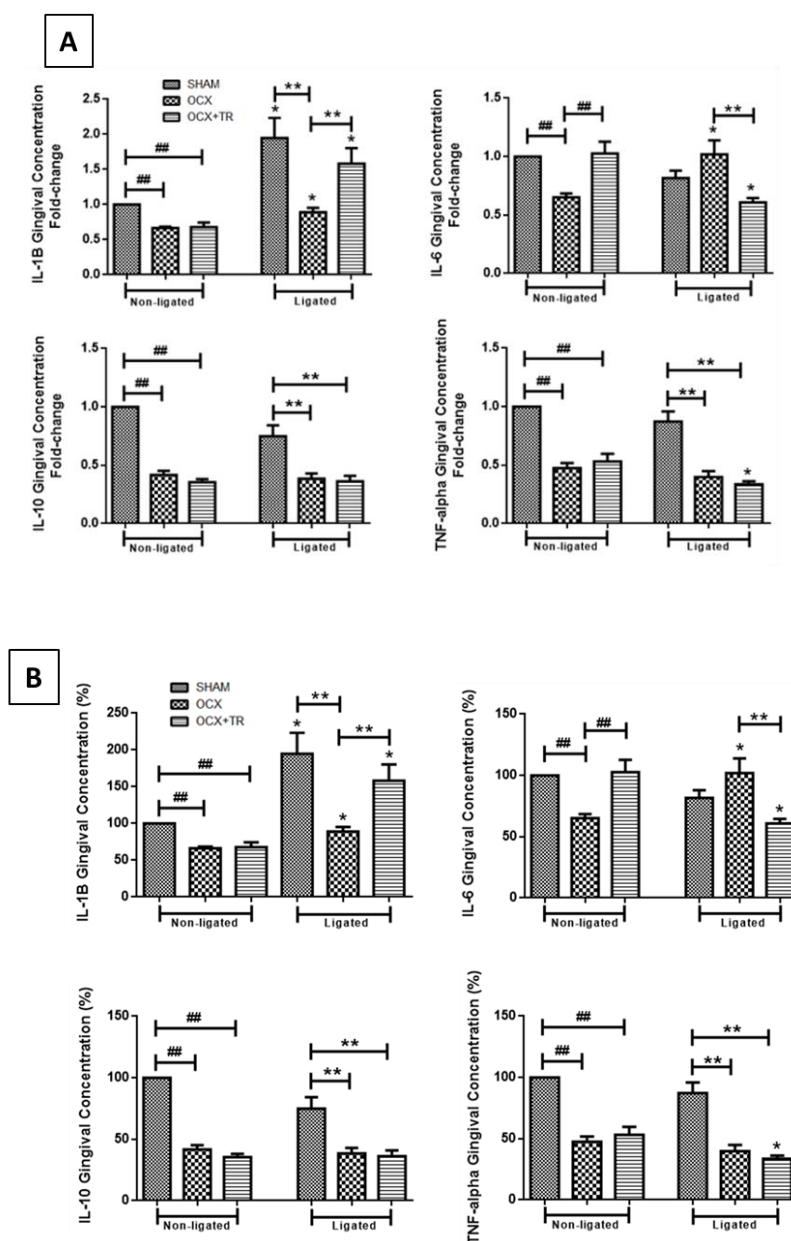


Figure 6- Fold-change (A) and percentage (B) of the concentration of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α in the gingival tissue according to the presence inflammation associated with host-microbial interactions (non-ligated vs ligated) and experimental conditions (Sham- hormonal competent control; OCX- Orchiectomy, OCX+TR- Orchiectomy+testosterone). Bars represent means and vertical lines standard deviations of the fold changes for each animal (n=10/group) calculated relatively to the mean average of cytokine concentration in the 10 animals of the sham-control animals. *p<0.05 when compared to the reference group non-ligated (one sample t test, assuming independence among the groups); ## and **p<0.05 (ANOVA, post-hoc Tukey) indicates the differences among the experimental groups according to the absence (non-ligated) or presence (ligated) of experimental periodontal disease, respectively.

Discussion

Development and progression of destructive periodontitis is mainly caused by the host response to the stimuli derived from the bacterial biofilm. Sustained increased production of high levels of pro-inflammatory mediators in the local microenvironment triggers a cascade of events that, in some individuals, results in extensive and irreversible degradation of both mineralized and non-mineralized

connective tissues of the periodontium^{24,25,26}. The biological activity of various cytokines and inflammatory mediators in the periodontal microenvironment may be directly related to the extent and severity of periodontal tissue destruction²⁷; however, the very production of these mediators can be influenced by environmental, genetic and systemic factors, including changes in the serum levels of sexual hormones, which are potent modulators of inflammation^{11,12,28}. In fact, our research group has reported on the influence of testosterone on bone tissue in association with the regulation of local production of cytokines¹⁹.

In this study, we focused on the impact of long-term testosterone depletion on the inflammatory bone resorption and inflammation associated with host-microbial interactions using the ligature-induced experimental periodontitis model in rats molar, that promotes pathologic changes histologically similar to those of human periodontitis²⁹. This experimental model effectively induced significant inflammatory bone resorption as indicated by μ CT. Long-term depletion of testosterone in the OCX group significantly attenuated inflammatory bone resorption (assessed by μ CT), an effect that was reversed by exogenous testosterone replacement (OCX+TR group). Paradoxically, the inflammatory infiltrate was attenuated in the OCX+TR group in comparison with the sham-operated group. It is important to consider that these are end-point analysis of the outcomes performed in a single time point; thus it is possible that the dynamics of active bone resorption and inflammation were distinct in early periods after initial ligature placement to induce inflammation.

In sharp contrast to these findings, previous publications by our group^{17,18} reported that orchietomy increased inflammatory bone resorption. We attribute this difference between the present study and our previous publications to the long-term testosterone depletion in the present study, which may have allowed for changes in cells participating in both physiological and pathological processes. Importantly, testosterone replacement reversed the bone-sparing effect of OCX, which supports a pro-resorptive role for testosterone in this model. Hormone replacement protocol was performed using a commercially-available drug (testosterone undecanoate – Nebido)^{##} designed to promote and maintain physiological levels of testosterone²², contrary to the study performed by our group¹⁸ that used a drug

^{##}Bayer, Socorro, Brazil.

(testosterone propionate – Durateston)* that induce supra-physiological levels. We did not strive to determine the biological mechanisms associated with this pro-resorptive role of testosterone, but we speculate it may be an indirect effect, mediated by regulation of local production of inflammatory and bone-resorptive mediators. However, in contrast with the putative immunosuppressive effect associated with testosterone depletion, there is evidence that reduced testosterone levels are associated with increased serum levels of IL-2, -6, -10 and -12; whereas exogenous testosterone replacement reduced the serum levels to near hormone-competent control level³⁰. Differences in the experimental approach may account for these discrepancies, as the age (12 months vs 4-5 months) and strain (Sprague-Dawley vs Holtzman) of the rats used were different. Moreover, testosterone depletion lasted 4 weeks in the previous study, as opposed to the 8-week period of hormone depletion in the present study. Still, contrary to the demonstrated by another work¹⁷ that observed a high and similar percentage of gingival inflammatory cells (approximately 40%) in orchietomized and sham animals submitted to ligature-induced periodontitis, our study showed that there was a marked reduction in the percentage of inflammatory cells to less than 20% in both groups, Sham and OCX, with a tendency to reduce inflammatory cellular components by orchietomy, which also may be related to the age of the rats and the experimental period employed.

The local production of inflammatory cytokines was influenced by testosterone depletion both in physiological and pathological conditions. In the absence of inflammation associated with experimental periodontitis (i.e., non-ligated animals / physiological conditions), lack of testosterone significantly reduced the production of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF. This suggests an immunostimulating effect of testosterone; which contrasts with the immunosuppressive effect of testosterone in the experimental autoimmune orchitis model¹³. Differences in the experimental model (autoimmune disease vs bacterial-induced inflammation) and in the relative abundance of testosterone receptors in cells of the testis in comparison with cells present in the non-inflamed gingival tissues may account for the discrepancies. Nevertheless, intriguingly testosterone replacement (OCX+TR) only rescued the

*Schering-Plough Pharmaceutical Industry LTDA, São Paulo, Brazil.

production of IL-6 in non-inflamed gingival tissues. In vitro, testosterone has been shown to increase IL-6 expression via a crosstalk between ERK1/2 MAPK and NF- κ B¹⁶.

These results have to be interpreted considering the peculiar population of cells present in the gingival tissue, as in the tissues of non-ligated animals the main sources of cytokines were resident, non-professional immune cells (e.g., epithelial cells, fibroblasts, osteoblasts); whereas in the tissues of ligated animals there were much greater numbers of professional immune leukocytes (e.g., neutrophils, migrating monocyte/macrophages, T and B cells). It is possible that testosterone exerts differential effects in immune and non-immune cells in the gingival tissues. In macrophages, testosterone reduced expression of TNF induced by oxidized low density lipoproteins (LDL)¹⁴, and in human leukocytes testosterone inhibited or tended to inhibit the production of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF and interferon (IFN)- after immune stimuli (LPS and Concanavalin A)³¹.

In the presence of inflammation associated with experimental periodontitis (ligated animals), depletion of testosterone in OCX animals was also associated with a reduction in the local production of IL-1 β , IL-10 and TNF; whereas IL-6 was increased. Testosterone replacement (OCX+TR) restored production of IL-1 β in the inflamed gingival tissues to levels similar to those of hormone-competent animals (ligated sham-control). Production of IL-6, IL-10 and TNF remained reduced in comparison to the sham-control animals, except the production of IL-6 that was elevated in castrated animals. This decrease of IL-6 by testosterone replacement (OCX+TR) may be related to the significant reduction of inflammatory cells in the gingival tissue of ligature-induced periodontal disease animals, showed in stereometric analysis. The rescue of local IL-1 β production in the OCX+TR group may be a mechanism relating serum testosterone levels and inflammatory bone resorption in this experimental model, considering that IL-1 β is a major pro-inflammatory cytokine and known to be associated with inflammatory bone resorption^{32,33}. Interestingly, in contrast with the restoration of physiological levels of testosterone, administration of supra-physiological levels of testosterone may have immunosuppressive effects, as indicated by the decrease in local production of IL-1 β reported by our research group in this same experimental model¹⁹. It is important to consider the peculiarities of the experimental model and approach used in this study. The ligature-induced model of periodontal disease is frequently used and considered as representative of destructive periodontitis in humans²³. This model

allows for the participation of live microorganisms that are naturally present in the animals, exhibiting a diversity of virulence factors, including toxins, peptidoglycans, products of the microbial metabolism and others. This diversity of antigens induces complex host-microbial interactions that may be represented in the profile of cytokines and inflammatory produced locally in the gingival tissue.

Testosterone depletion was induced using a long-established castration model³⁴ that was previously used by our research group^{17,18,19}. The testosterone replacement protocol used has been shown to restore serum levels of testosterone to physiological levels in prolonged periods²². In contrast to previous publications by our research group^{17,18,19}, we used a longer period between castration surgery (OCX and OCX+TR groups) and the induction of periodontal disease to allow for the occurrence of long-term changes associated with testosterone depletion, since complete blockage of testosterone residual effects occurs only 60 days after castration³⁵.

Importantly, using orchietomy as an experimental approach to deplete testosterone was effective (free serum testosterone was not detectable in the serum of OCX animals) and the hormonal replacement protocol caused a slight and continuous increase of serum testosterone concentration throughout the experimental period, but remaining at physiological levels. In spite of the statistically significant increase in serum testosterone in OCX+TR animals compared with sham-controls, the magnitude of this increase was small (variation of 2.36 ± 0.69 ng/mL), compared with testosterone concentrations considered supra-physiological, in which serum levels were increased by nearly 20 ng/mL in comparison to sham-controls¹⁸.

Reduced levels of estradiol in the testosterone-depleted animals may also influence the outcomes of inflammatory bone resorption and local cytokine expression. In our experimental approach we cannot rule out this possibility, since testosterone may be converted into 17-estradiol and downstream estradiol metabolites, particularly in an inflamed microenvironment³⁶. In fact, the aromatization rate of exogenously-administered testosterone is higher than that of the naturally-produced testosterone^{37,38}. Of note, the bone-sparing effects of estrogens are long acknowledged³⁹; and the estrogen-induced attenuation of experimental osteoporosis in female ovariectomized rats is mediated, at least in part, by the inhibition of IL-6 and IL-1 production⁴⁰. Interestingly there is evidence that even immune cells, such as macrophages, when present in non-inflamed microenvironments have a less

pronounced conversion of testosterone into estradiol⁴¹. This phenomenon may be related with distinct biological mechanisms for the indirect effects of testosterone on cytokine production in non-inflamed and inflamed gingival tissue.

In summary, the results of the present study indicate that long-term depletion of testosterone reduces inflammatory bone resorption. We speculate that the attenuation of bone resorption associated with testosterone depletion is mediated by indirect mechanisms related with the decreased local production of IL-1 β in the gingival tissues. Interestingly, in the absence of inflammation testosterone depletion also reduced the production of inflammatory cytokines in the gingival tissues, without any detectable effect on alveolar bone turnover. The biological effects of testosterone depletion in healthy and diseased gingival tissues may be mediated by distinct mechanisms, considering the differences in the predominant population of cells in each condition. It is important to bear in mind the limitations of this study regarding its internal validity, such as considerations regarding the experimental model used⁴², and particularly the relatively small sample size and the assessment of gingival inflammation by morphometric/stereometric methods as opposed to the identification of inflammatory cells by immunohistochemistry or flow cytometry. Also, because of limitations in the sample quantity and resources available, we used a candidate-approach to study the production of proteins relevant for inflammation associated with periodontal disease, which may have left out important biological mediators. These limitations indicate caution in making assumptions regarding the external validity of the data (i.e., the clinical translational of the information). Moreover, besides the limitations associated with a pre-clinical study, humans frequently present comorbidities associated with the primary conditions that required testosterone replacement and/or the concomitant use of other medications and substances that may influence the immune-inflammatory response. Nevertheless, the results are consistent and we think they provide interesting insight into the influence of testosterone depletion in bacterial-induced inflammation and alveolar bone resorption.

Conclusion

The findings of the present study suggest that testosterone depletion attenuates inflammatory bone resorption in ligature-induced periodontitis, which may be partly mediated via decreased production of IL-1 β .

Acknowledgments

We are grateful to Mr. José Antonio Sampaio Zuanon and Miss Juliana Pirola (Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry at Araraquara, UNESP), who helped with the histological processing.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. da Costa TA, Silva MJB, Alves PM, et al. Inflammation biomarkers of advanced disease in nongingival tissues of chronic periodontitis patients. *Mediators Inflamm* 2015; 2015:983782. doi: 10.1155/2015/983782.
2. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol* 2005; 76(11): 2033-2041.
3. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res* 2014; 93(11) : 1045-1053.
4. Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Lavery D, Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review. *J Clin Periodontol* 2017; 44(18) : S94-S105.
5. Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol* 2000 2002; 29 : 177-206.
6. Deepa D, Jain G. Assessment of periodontal health status in postmenopausal women visiting dental hospital from in and around Meerut city: cross-sectional observational study. *J Midlife Health* 2016; 7(4) : 175-179.
7. Passos-Soares JS, Vianna MIP, Gomes-Filho IS, et al. Association between osteoporosis treatment and severe periodontitis in postmenopausal women. *Menopause* 2017; 24(7) : 789-795.

8. Steffens JP, Wang X, Starr JR, Spolidorio LC, Van Dyke TE, Kantarci A. Associations between sex hormone levels and periodontitis in men: results from NHANES III. *J Periodontol* 2015; 86(10) : 1116-1125.
9. Graves DT, Li J, Cochran DL. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res* 2011; 90(2) : 143-153.
10. Nanci A., Bosshardt D. D. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000* 2006; 40(1) : 11–28.
11. Clarke BL, Khosla S. Androgens and bone. *Steroids* 2009; 74 : 296–305.
12. Vodo S, Bechi N, Petroni A, Muscoli C, Aloisi AM. Testosterone-induced effects on lipids and inflammation. *Mediators Inflamm* 2013; 2013 : 183041. doi: 10.1155/2013/183041
13. Fijak M, Schneider E, Klug J, et al. Testosterone replacement effectively inhibits the development of experimental autoimmune orchitis in rats: evidence for a direct role of testosterone on regulatory T cell expansion. *J Immunol* 2011; 186(9) : 5162-5172.
14. Corcoran MP, Meydani M, Lichtenstein AH, Schaefer EJ, Dillard A, Lamon-Fava S. Sex hormone modulation of proinflammatory cytokine and C-reactive protein expression in macrophages from older men and postmenopausal women. *J Endocrinol* 2010; 206(2) : 217-224.
15. Benten WP, Guo Z, Krücken J, Wunderlich F. Rapid effects of androgens in macrophages. *Steroids* 2004; 69(8-9) : 585-590.
16. Su C, Chen M, Huang H, Lin J. Testosterone enhances lipopolysaccharide-induced interleukin-6 and macrophage chemotactic protein-1 expression by activating the extracellular signal-regulated kinase 1/2/nuclear factor- κ B signalling pathways in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Med Rep* 2015; 12(1) : 696-704.
17. Steffens JP, Coimbra LS, Rossa C Jr, Kantarci A, Van Dyke TE, Spolidorio LC. Androgen receptors and experimental bone loss - an in vivo and in vitro study. *Bone* 2015; 81 : 683-90.

18. Steffens JP, Coimbra LS, Ramalho-Lucas PD, Rossa C Jr, Spolidorio LC. The effect of supra- and subphysiologic testosterone levels on ligature-induced bone loss in rats--a radiographic and histologic pilot study. *J Periodontol* 2012; 83(11) : 1432-1439.
19. Steffens JP, Herrera BS, Coimbra LS, et al. Testosterone regulates bone response to inflammation. *Horm Metab Res* 2014; 46(3) : 193–200.
20. Cao JJ, Wronski TJ, Iwaniec U, et al. Aging increases stromal/osteoblastic cell-induced osteoclastogenesis and alters the osteoclast precursor pool in the mouse. *J Bone Miner Res* 2005; 20(9) : 1659-1668.
21. Ucer S, Iyer S, Kim HN, et al. The effects of aging and sex steroid deficiency on the murine skeleton are independent and mechanistically distinct. *J Bone Miner Res* 2017; 32(3) : 560-574.
22. Callies F, Kollenkirchen U, von zur Mühlen C, Tomaszewski M, Beer S, Allolio B. Testosterone undecanoate: a useful tool for testosterone administration in rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003; 111(4): 203-208.
23. de Souza JA, Nogueira AV, de Souza PP, Cirelli JA, Garlet GP, Rossa C Jr. Expression of suppressor of cytokine signaling 1 and 3 in ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol* 2011; 56(10) : 1120-1128.
24. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 1991; 26 : 230-242.
25. Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes Infect* 2000; 2 : 1181-1192.
26. Souza JA, Rossa C Jr, Garlet GP, Nogueira AV, Cirelli JA. Modulation of host cell signaling pathways as a therapeutic approach in periodontal disease. *J Appl Oral Sci* 2012; 20(2) : 128-138.
27. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2008; 79: 1585-1591.
28. Gilliver SC. Sex steroids as inflammatory regulators. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010; 120 : 105–115.

29. Spolidorio LC, Lucas PD, Steffens JP, et al. Influence of parstatin on experimental periodontal disease and repair in rats. *J Periodontol* 2014; 85(9): 1266-1274.
30. Freeman BM, Mountain DJ, Brock TC, et al. Low testosterone elevates interleukin family cytokines in a rodent model: a possible mechanism for the potentiation of vascular disease in androgen-deficient males. *J Surg Res* 2014; 190(1) : 319-327.
31. Janele D, Lang T, Capellino S, Cutolo M, Da Silva JA, Straub RH. Effects of testosterone, 17beta-estradiol, and downstream estrogens on cytokine secretion from human leukocytes in the presence and absence of cortisol. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1069: 168-182.
32. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol* 2000; 71 : 1535-1545.
33. Nishida E, Hara Y, Kaneko T, Ikeda Y, Ukai T, Kato I. Bone resorption and local interleukin-1alpha and interleukin-1beta synthesis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *J Periodontal Res* 2001; 36(1) : 1-8.
34. Vanderschueren D, Van Herck E, Suiker AM, Visser WJ, Schot LP, Bouillon R. Bone and mineral metabolism in aged male rats: short and long term effects of androgen deficiency. *Endocrinology* 1992; 130(5) : 2906-2916.
35. Cheng CL, de Groat WC. Effect of orchietomy and testosterone replacement on lower urinary tract function in anesthetized rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2016; 311(5) : F864-F870.
36. Castagnetta LA, Carruba G, Granata OM, et al. Increased estrogen formation and estrogen to androgen ratio in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003; 30(12) : 2597-2605.
37. Zmudaa JM, Bausserman LL, Maceroni D, Thompson PD. The effect of supraphysiologic doses of testosterone on fasting total homocysteine levels in normal men. *Atherosclerosis* 1997; 130(1-2) : 199-202.
38. Dias JP, Veldhuis JD, Carlson O, et al. Effects of transdermal testosterone gel or an aromatase inhibitor on serum concentration and pulsatility of growth hormone in older men with age-related low testosterone. *Metabolism* 2017; 69 : 143-147.

39. Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996; 11(8) : 1043-1051.
40. Jin Y, Lee M, Park Y. Synergistic attenuation of ovariectomy-induced bone loss by combined use of fish oil and 17 β -oestradiol. *Br J Nutr*. 2017; 117(4) : 479-489.
41. Schmidt M, Kreutz M, Löffler G, Schölmerich J, Straub RH. Conversion of dehydroepiandrosterone to downstream steroid hormones in macrophages. *J Endocrinol* 2000; 164(2) : 161-169.
42. Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C Jr. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Front Oral Biol* 2012; 15:117-32.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste trabalho, conclui-se que:

Concentração supra e subfisiológica de testosterona, o bloqueio de seus receptores e inibição da aromatase, alteraram parte ou partes dos complexos eventos associados a formação do tecido de granulação e a reabsorção óssea.

- **No modelo de reparo tecidual cutâneo:**

Nível suprafisiológico de testosterona estimulou a maturação do tecido de granulação;
Flutamida, fulvestranto e anastrozol não alteraram o processo inflamatório;
Flutamida e fulvestranto aceleraram a retração da ferida cutânea.

- **No modelo de reabsorção óssea em calvária:**

Nível subfisiológico de testosterona mostrou tendência em aumentar a reabsorção óssea;
Concentração suprafisiológica atuou preservando o percentual de volume ósseo;
Flutamida e fulvestranto favoreceram a atividade de osteoclastos;
Flutamida acentuou a reabsorção óssea.

- **No modelo de doença periodontal:**

Depleção de testosterona atenuou a reabsorção óssea inflamatória.

REFERÊNCIAS*

1. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins patologia básica. 9ªed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.
2. Eming SA, Martin, P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med.* 2014; 6(265): 265sr6.
3. Zhang C, Ponugoti B, Tian C, Xu F, Tarapore R, Batres A, et al. FOXO1 differentially regulates both normal and diabetic wound healing. *J Cell Biol.* 2015; 209(2): 289-303.
4. Gilliver SC, Ashworth JJ, Mills SJ, Hardman MJ, Ashcroft GS. Androgens modulate the inflammatory response during acute wound healing. *J Cell Sci.* 2006; 119(Pt 4):722-32.
5. Ashcroft GS, Mills SJ. Androgen receptor-mediated inhibition of cutaneous wound healing. *J Clin Invest.* 2002; 110(5): 615-24
6. Clarke BL, Khosla S. Androgens and bone. *Steroids.* 2009; 74(3): 296-305.
7. Gilliver SC. Sex steroids as inflammatory regulators. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010; 120(2-3): 105-15.
8. Steffens JP, Herrera BS, Coimbra LS, Stephens DN, Rossa C Jr, Spolidorio LC, et al. Testosterone regulates bone response to inflammation. *Horm Metab Res.* 2014; 46(3): 193-200.
9. Steffens JP, Coimbra LS, Rossa C Jr, Kantarci A, Van Dyke TE, Spolidorio LC. Androgen receptors and experimental bone loss - an in vivo and in vitro study. *Bone.* 2015; 81: 683-90.
10. Chenu C, Adlanmerini M, Boudou F, Chantalat E, Guihot AL, Toutain C, et al. Testosterone prevents cutaneous ischemia and necrosis in males through complementary estrogenic and androgenic actions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017; 37(5): 909-19.
11. Romana-Souza B, Assis de Brito TL, Pereira GR, Monte-Alto-Costa A. Gonadal hormones differently modulate cutaneous wound healing of chronical stressed mice. *Brain Behav Immun.* 2014; 36: 101-10.
12. Colvard DS, Eriksen EF, Keeting PE, Wilson EM, Lubahn DB, French FS, et al. Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1989; 86(3): 854-7.

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaoatualizado.pdf>

13. Vanderschueren D, Laurent MR, Claessens F, Gielen E, Lagerquist MK, Vandenput L, et al. Sex steroid actions in male bone. *Endocr Rev.* 2014; 35(6): 906-60.
14. Ucer S, Iyer S, Bartell SM, Martin-Millan M, Han L, Kim HN, et al. The effects of androgens on murine cortical bone do not require ar or era signaling in osteoblasts and osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 2015; 30(7): 1138-49.
15. Steffens JP, Coimbra LS, Ramalho-Lucas PD, Rossa C Jr, Spolidorio LC. The effect of supra and subphysiologic testosterone levels on ligature-induced bone loss in rats — a radiographic and histologic pilot study. *J Periodontol.* 2012; 83(11): 1432-9.
16. Vandenput L, Ohlsson C. Sex steroid metabolism in the regulation of bone health in men. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010; 121(3-5): 582-8.
17. Golds G, Houdek D, Arnason T. Male hypogonadism and osteoporosis: the effects, clinical consequences, and treatment of testosterone deficiency in bone health. *Int J Endocrinol.* 2017; 2017: 4602129.
18. Osta RE, Almont T, Diligent C, Hubert N, Eschwège P, Hubert J. Anabolic steroids abuse and male infertility. *Basic Clin Androl.* 2016; 26: 2.
19. Giorgetti R, di Muzio M, Giorgetti A, Girolami D, Borgia L, Tagliabracci A. Flutamide-induced hepatotoxicity: ethical and scientific issues. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017; 21(1): 69-77.
20. Hohl A, Marques MO, Coral MH, Walz R. Evaluation of late-onset hypogonadism (andropause) treatment using three different formulations of injectable testosterone. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009; 53(8): 989-95.
21. Brahm J, Brahm M, Segovia R, Latorre R, Zapata R, Poniachik J. Acute and fulminant hepatitis induced by flutamide: case series report and review of the literature. *Ann Hepatol.* 2011; 10(1): 93-8.
22. Carlson RW. The history and mechanism of action of fulvestrant. *Clin Breast Cancer.* 2005; 6 (Suppl 1): S5-8.
23. Poggio F, Lambertini M, Blondeaux E, Vaglica M, Levaggi A, Pronzato P. Role of fulvestrant in the treatment of postmenopausal metastatic breast cancer patients. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2016; 9(9): 1153-61.
24. Pizzuti L, Natoli C, Gamucci T, Mauri M, Sergi D, Di Lauro L, et al. Anthropometric, clinical and molecular determinants of treatment outcomes in postmenopausal, hormone receptor positive metastatic breast cancer patients treated with fulvestrant. Results from a real world setting. *Oncotarget.* 2017; 8(40):69025-37.
25. Schlegel PN. Aromatase inhibitors for male infertility. *Fertil Steril.* 2012; 98(6): 1359-62.
26. Majzoub A, Sabanegh E Jr. Testosterone replacement in the infertile man. *Transl Androl Urol.* 2016; 5(6): 859-65.

27. Losurdo A, Rota S, Gullo G, Masci G, Torrisi R, Bottai G, et al. Controversies in clinicopathological characteristics and treatment strategies of male breast cancer: a review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017; 113: 283-91.
28. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*. 2012; 49(1): 35-43.
29. Daley JM, Reichner JS, Mahoney EJ, Manfield L, Henry WL, Mastrofrancesco B, et al. Modulation of macrophage phenotype by soluble product(s) released from neutrophils. *J Immunol*. 2005; 174(4): 2265-72.
30. Tziotzios C, Profyris C, Sterling J. Cutaneous scarring: pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part II. Strategies to reduce scar formation after dermatologic procedures. *J Am Acad Dermatol*. 2012; 66(1): 13-24.
31. Profyris C, Tziotzios C, Do Vale I. Cutaneous scarring: pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part I. The molecular basis of scar formation. *J Am Acad Dermatol* 2012; 66(1): 1-10.
32. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008; 453(7193): 314-21.
33. Endrich B, Menger MD. Regeneration of the microcirculation during wound healing? *Unfallchirurg*. 2000; 103(11): 1006-8.
34. Robson MC, Steed DL, Franz MG. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg*. 2001; 38(2): 72-140.
35. Bauer SM. Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds. *Vasc Endovasc Surg* 2005; 39(4): 293-306.
36. Ashcroft GS, Greenwell-Wild T, Horan MA, Wahl SM, Ferguson MW. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. *Am J Pathol*. 1999; 155(4): 1137-46.
37. Lai JJ, Lai KP, Chuang KH, Chang P, Yu IC, Lin WJ et al. Monocyte/macrophage androgen receptor suppresses cutaneous wound healing in mice by enhancing local TNF-alpha expression. *J Clin Invest*. 2009; 119(12): 3739-51.
38. Wang Y, Simanainen U, Cheer K, Suarez FG, Gao YR, Li Z, et al. Androgen actions in mouse wound healing: Minimal in vivo effects of local antiandrogen delivery. *Wound Repair Regen*. 2016; 24(3): 478-88.
39. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological bone remodeling: systemic regulation and growth factor involvement. *Physiology (Bethesda)*. 2016; 31(3): 233-45.
40. Redlich K, Smolen JS. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov*. 2012; 11(3): 234-50.

41. Kawano H, Sato T, Yamada T, Matsumoto T, Sekine K, Watanabe T., et al. Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100(16): 9416-21.
42. Notini AJ, McManus JF, Moore A, Bouxsein M, Jimenez M, Chiu WS, et al. Osteoblast deletion of exon 3 of the androgen receptor gene results in trabecular bone loss in adult male mice. *J Bone Miner Res.* 2007; 22(3): 347-56.
43. Chiang C, Chiu M, Moore AJ, Anderson PH, Ghasem-Zadeh A, McManus JF et al. Mineralization and bone resorption are regulated by the androgen receptor in male mice. *J Bone Miner Res.* 2009; 24(4): 621-31.
44. Windahl SH, Börjesson AE, Farman HH, Engdahl C, Movérare-Skrtic S, Sjögren K, et al. Estrogen receptor- α in osteocytes is important for trabecular bone formation in male mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2013; 110(6): 2294-9.
45. Melville KM, Kelly NH, Surita G, Buchalter DB, Schimenti JC, Main RP, et al. Effects of deletion of $er\alpha$ in osteoblast-lineage cells on bone mass and adaptation to mechanical loading differ in female and male mice. *J Bone Miner Res.* 2015; 30(8): 1468-80.
46. Famili P, Cauley JA, Greenspan SL. The effect of androgen deprivation therapy on periodontal disease in men with prostate cancer. *J Urol.* 2007; 177(3): 921-4.


APÊNDICE - Descrição do Material e Método (Publicações 1 a 5)

MATERIAL E MÉTODO (CAPÍTULOS 1 A 4)

Animais

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (Processo CEUA/FOAr #47/2014). Quarenta ratos machos (*Rattus norvegicus* albinos, Holtzman), 3-4 meses de idade, foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (n = 10/grupo), mantidos a uma temperatura de 23°C ±2, umidade de 65-75% e ciclo de luz controlado (12h luz-12h escuro), com ração e água disponível *ad libitum*. Os grupos e condições experimentais são demonstrados na Figura A1.

Figura A1- Representação da distribuição de ratos por grupo experimental.



GRUPOS	TRATAMENTO	<i>P. Gingivalis</i> EM CALVÁRIA E FERIDA CUTÂNEA	<i>P. Gingivalis</i> EM CALVÁRIA	<i>P. Gingivalis</i> EM CALVÁRIA	EUTANÁSIA
G1 (n=10)	SEM TRATAMENTO	SIM	SIM	SIM	SIM
G2 (n=10)	DURATESTON	SIM	SIM	SIM	SIM
G3 (n=10)	ORQUIECTOMIA (OQX)	SIM	SIM	SIM	SIM
G4 (n=10)	OQX+DURATESTON	SIM	SIM	SIM	SIM
G5 (n=10)	ANASTROSOL	SIM	SIM	SIM	SIM
G6 (n=10)	FULVESTRANTO	SIM	SIM	SIM	SIM
G7 (n=10)	FLUTAMIDA	SIM	SIM	SIM	SIM
G8 (n=10)	DURATESTON+ANASTROSOL	SIM	SIM	SIM	SIM

OQX - Orquiectomia total (exposição, manipulação e remoção dos testículos). Todos os tratamentos foram iniciados 15 dias antes da indução da ferida cutânea e inoculação de *P. gingivalis* na calvária.

Fonte: Elaboração própria.

Animais controle

Os animais deste grupo foram submetidos apenas ao procedimento cirúrgico para indução de ferida cutânea e inoculação de *P. gingivalis* em calvária, e não receberam tratamento farmacológico específico (Figura A1).

Orquiectomia

Resumidamente, 20 ratos (n=10/grupo) receberam anestesia com ketamina (1mL/Kg) e xilazina (0,4 mL/Kg) e, em seguida, sob condições estéreis, foi realizada incisão escrotal para remoção testicular bilateral, e em sequência sutura com fio reabsorvível. Os ratos receberam ketoflex (0,03 ml/rato, via intramuscular) para alívio da dor pós-operatória e uma combinação de sais de benzilpenicilina e estreptomicina (Pentabiótico/0,2ml/rato, via intramuscular). Após o procedimento, os animais foram mantidos em gaiolas separadas para recuperação durante uma semana (Figura A1).

Tratamento com durateston

Os animais deste grupo (20 ratos - n=10/grupo) receberam, semanalmente, administração intramuscular de 250 mg/kg de Durateston (Schering-Plough) diluída em 0,1 ml de óleo de milho (Steffens et al., 2012). O tratamento foi realizado até o final do período experimental (Figura A1).

Inibição farmacológica de receptores de andrógeno

Os animais deste grupo receberam flutamida (F9397, Sigma-Aldrich) a uma dose de 50 mg/kg de peso corporal, via gavagem oral, a cada 02 dias (Kurling-Kailanto et al., 2010) (Figura A1).

Inibição farmacológica de receptores de estrógeno

Os animais deste grupo receberam diariamente a dose de 1,5 mg/kg de peso corporal de fulvestranto (I4409, Sigma-Aldrich), via subcutânea, (Moussa et al., 2012) (Figura A1).

Inibição farmacológica da enzima aromatase

Neste grupo, os animais receberam diariamente a dose de 0,2 mg/kg de peso corporal de anastrozol (A273, Sigma-Aldrich) via gavagem oral (Vekariya et al., 2013) (Figura A1).

Análise do nível sérico de testosterona e Peso dos animais

Amostras de sangue caudal foram coletadas de cada animal no dia 0 (baseline), anterior à orquiectomia e administração de testosterona. No dia do sacrifício foram coletadas amostras de sangue de cada animal, por punção cardíaca, para avaliação da concentração hormonal final. O nível sérico de testosterona foi avaliado utilizando-se imunoensaio de quimioluminescência (Immulite 2000, Siemens Healthcare Diagnostics, Gwynedd, Reino Unido) no Laboratório de Análises Clínicas São Lucas/Araraquara-SP.

O peso dos animais também foi registrado no momento da eutanásia (dia 21) e avaliado comparativamente ao peso obtido no dia 0.

Indução da ferida cutânea

Após 15 dias do início dos tratamentos, os animais foram submetidos a anestesia com ketamina (1 mL/kg) e xilazina (0,4 mL/kg) para realização de procedimento cirúrgico para indução de ferida cutânea na região dorsal, localizada na linha média. O animal foi colocado em decúbito esternal e após tricotomia, a antisepsia da região dorsal foi realizada com 2% de digluconato de clorexidina. Para a ressecção circular da pele, no centro da área depilada, as incisões foram feitas por rotação da borda cortante do punch metálico, medindo 0,6cm de diâmetro, até a exposição da fáscia muscular dorsal. As lesões permaneceram abertas, não recebendo nenhum tratamento oclusivo para que não interferisse na cicatrização, e a hemostasia foi realizada por compressão digital usando gaze estéril. Os ratos receberam acetaminofeno (300 mg/kg/peso corporal, via oral) para alívio da dor pós-operatória e uma combinação de sais de benzilpenicilina e estreptomicina (Pentabiótico/0,2 ml/rato, via intramuscular). Após 7 dias de

indução da ferida cirúrgica (dia 21), os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico e os tecidos coletados para análise.

Eutanásia e coleta das amostras

Após o período experimental, todos os ratos foram eutanasiados por aprofundamento anestésico e as amostras das feridas coletadas e divididas ao meio. Metade foi fixada em solução de paraformaldeído a 4% durante 48 horas. Após a fixação, as peças foram lavadas em água corrente, desidratadas em série crescente de álcoois e diafanizadas em xilol. Após a diafanização, as peças foram incluídas em parafina, de forma padronizada para obtenção de cortes histológicos semi-seriados de 5 μm que foram corados com hematoxilina e eosina, tricrômico de masson e picrosirius red. A outra metade foi congelada a -80° para análise do perfil de citocinas inflamatórias através do imunoenensaio multiplex.

Análise estereométrica

As imagens dos cortes microscópicos corados em H&E foram capturadas utilizando-se câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio de luz comumente transmitida e objetiva de 40x (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemanha). Uma grade de $32.400 \mu\text{m}^2$ com 9×4 quadrados de $30 \mu\text{m}$ foi construída usando um software/editor de imagem (Adobe Photoshop CS5) e sobreposto nas imagens digitais obtidas dos cortes histológicos. As avaliações foram realizadas na região de transição de ferida/tecido normal, em lados opostos, considerando-se as duas bordas da ferida, além de um campo central da mesma. Um único examinador, previamente treinado e calibrado, realizou a análise estereométrica através da técnica de contagem de pontos. Foram feitas a determinação da densidade volumétrica (%) de células inflamatórias, fibroblastos (identificados como células fusiformes ou estreladas, núcleo ovóide ou alongado), matriz extracelular, figuras vasculares, e em cada grupo, a partir dos valores obtidos das medidas de cada animal foram estabelecidos as médias e os desvios padrão.

A avaliação foi complementada pela análise qualitativa através dos cortes corados por Tricrômico de Masson.

Mensuração do colágeno birrefringente (Picrosirius Red)

A densidade volumétrica (%) de colágeno nas regiões de borda e centro da ferida foi estimada a partir de cortes corados com solução a 0,1% de PicroSirius Red (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA). Os cortes foram analisados com filtros de polarização acoplados ao microscópio de luz (BX-51, Olympus, Tóquio, Japão). Foi utilizado 1 corte de cada animal, e 1 imagem foi capturada de cada uma das três regiões da ferida, como descrito anteriormente, com o auxílio de uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) e objetiva de 20x. Todas as imagens foram capturadas com parâmetros padronizados de intensidade de luz, abertura do diafragma do condensador, altura do condensador, objetiva, angulação do polarizador e brilho da imagem. A quantidade de colágeno foi estimada utilizando-se metodologia previamente descrita na literatura (Fonseca et al., 2014), através do processador de imagens ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), em que as cores proporcionadas pela birrefringência das imagens são isoladas utilizando-se o histograma de matiz disponível na guia “Color Threshold”. As imagens foram convertidas para preto e branco, de modo que cada pixel não preto se tornou branco e cada pixel preto permaneceu preto. Em seguida, a porcentagem ocupada por cada cor foi calculada a partir do número de pixels em cada faixa de matiz. Para esta mensuração, manipulou-se o histograma de matiz para selecionar cada comprimento de onda, ou seja, vermelho/alaranjado (matizes 2 a 38 e 230 a 256), amarelo (matiz 39 a 51) e verde (matiz 52 a 128). O número de pixels de cada frequência de cor foi expresso como porcentagem do total de colágeno birrefringente daquele comprimento de onda no total da imagem.

Análise da contração das feridas

Foi realizada a mensuração linear dos cortes histológicos das feridas cutâneas, com o objetivo de avaliar a contração das lesões. Os cortes histológicos corados com H&E foram fotografados usando microscópio de luz comumente transmitida e objetiva de 4x (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemanha) e, em seguida, foi realizada análise utilizando-se o software Imagem J. Foi traçada uma linha entre as bordas das feridas e, automaticamente, o software gerou a medida em micrômetros, e em cada grupo, a partir dos valores obtidos de cada mensuração por animal foram estabelecidos as médias e desvios padrão.

Imunohistoquímica

A imunomarcção do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e do fator de crescimento de queratinócitos (KGF) foram avaliadas por imunohistoquímica. O protocolo, previamente padronizado, foi estabelecido para cada anticorpo: PCNA (1:50 - Invitrogen 133900) e KGF (1:25-ab131162-Abcam). As proteínas alvo foram detectadas utilizando-se o sistema DAB-estreptavidina (LSAB-2, Dako Cytomation) e, em seguida, os cortes foram corados com hematoxilina e as lamínulas montadas com Permount. As imagens foram capturadas através de câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada em um microscópio de luz comumente transmitida e objetiva de 40x (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemanha). A quantificação de células imunomarcadas (fibroblastos) foi realizada no tecido conjuntivo próximo as bordas da ferida e na área central para o anticorpo de PCNA, enquanto que para a quantificação de queratinócitos expressando o anticorpo KGF, apenas o epitélio das bordas da ferida foi considerado. Para a determinação do número de células em proliferação, foram consideradas aquelas com marcação positiva (marcação marrom) dentro dos campos selecionados.

Expressão de citocinas inflamatórias locais (MULTIPLEX)

A concentração tecidual de VEGF, IL-6, TNF- α , TGF- β 1 e PDGF foi avaliada por ensaio multiplex (Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho - LACTAD/UNICAMP - Campinas/SP). As amostras de proteínas totais foram extraídas com RIPA Lysis Buffer reagente, 10x (Merck, Millipore) e quantificadas pelo método BCA Protein Assay (Novagen, EMD Chemicals), de acordo com as instruções do fabricante. Para o ensaio multiplex, utilizou-se o Milliplex Kit (EMD Millipore), que fornece análise de diferentes analitos em um mesmo poço da placa, e o ensaio completo foi realizado de acordo com os protocolos de cada kit e as instruções do fabricante. Os resultados do ensaio foram normalizados dividindo-se pelos respectivos valores de proteína alvo obtidos na quantificação pelo método de ensaio de proteína BCA. Os dados gráficos foram expressos em fold-change.

Análise dos dados

Os dados foram submetidos aos testes de homogeneidade e distribuição usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, one-way ANOVA e o pós-teste de Tukey foram realizados para análise comparativa entre os grupos, e o teste t para comparar o nível de testosterona final e baseline, assim como para realizar a análise comparativa do peso dos animais. Todas as análises foram realizadas usando o software de análises estatísticas GraphPad Prism 6. Todos os testes foram aplicados com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

Cepas bacterianas, cultura e contagem

Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 foi cultivada em meio de ágar Brucella suplementado com 1 μ L/mL de hemin, 0,1 μ L/mL de menadiona e 5% de sangue de ovelha desfibrinada e, em seguida, mantida durante 72 horas em câmara de anaerobiose (80% de N₂, 10% de CO₂ e 10% de H₂) (Whitley MG-500- Estação anaeróbica) a 37°C, de acordo com as condições fisiológicas do microrganismo. Uma curva de crescimento bacteriano foi utilizada para

estabelecer a fase logarítmica ou exponencial, determinar a densidade óptica e a concentração do microrganismo em UFC/ml (unidades formadoras de colônias por mililitro). A densidade bacteriana foi mensurada através de espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm (Eppendorf AG, 22331, Hamburgo, Alemanha).

Inoculação de Porphyromonas gingivalis na região subcutânea na linha média da calvária

Quinze dias após os tratamentos, foi realizada na linha média da calvária de ratos a inoculação de 1000 μ L de 4×10^9 UFC/mL de suspensão bacteriana; no dia 17, uma segunda inoculação foi realizada duas vezes ao dia, cada uma contendo 500 μ L de 4×10^9 UFC/mL de suspensão bacteriana, e no dia 19, uma terceira e última injeção foi realizada, seguindo o mesmo protocolo da segunda administração. Os animais de todos os grupos foram eutanasiados no dia 21, correspondendo 7 dias após a primeira inoculação bacteriana.

Avaliação macroscópica e Coleta das amostras

No momento da eutanásia, avaliação macroscópica foi realizada para observação da presença de edema e exsudato sobre a calvária. Em seguida, o tecido cutâneo da calvária foi removido e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C . As amostras de calvária foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% durante 48 horas, em seguida lavadas em água corrente e transferidas para álcool 70%.

Microtomografia computadorizada (μ CT)

As amostras de calvária foram escaneadas usando sistema de microtomografia computadorizada (Skyscan, Aartselaar, Bélgica). O escaneamento foi realizado com resolução de 18 μ m, 80kV, 300 μ A e filtro de atenuação de alumínio 0,5. Em cada amostra, foi padronizada uma região de interesse (ROI) entre a sutura anterior e posterior da calvária, e a fração do volume ósseo (volume ósseo/volume total - BV/TV, %) foi calculada pelo software CT-scan.

Análise microscópica

Após o escaneamento por microtomografia, todas as amostras foram descalcificadas em 10% de solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), desidratadas e depois incluídas em parafina em uma orientação espacial padronizada para obtenção de cortes semi-seriados de 5 µm de espessura no plano frontal, que foram corados posteriormente com hematoxilina e eosina (H&E). As imagens dos cortes histológicos foram capturadas usando uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada em um microscópio de luz comumente transmitida e objetiva de 40x (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemanha). Foram quantificados nos cortes histológicos, em toda a extensão da calvária, o número de osteoclastos e áreas de reabsorção, por um único examinador treinado e calibrado previamente.

Imunohistoquímica

Os cortes histológicos também foram utilizados para avaliar a imunexpressão de TRAP (K17 – sc-30833). O procedimento para imunohistoquímica foi padronizado (1:50) e as proteínas alvo foram detectadas usando o sistema DAB-estreptavidina (LSAB-2, Dako Cytomation). Os cortes foram corados com hematoxilina e as lamínulas montadas com Permount. As imagens foram capturadas usando uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio de luz comumente transmitida e objetiva de 40x (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemanha). Para a quantificação de osteoclastos TRAP+, foram consideradas as células com marcação castanho claro, em toda a extensão da calvária, mensuradas por um único examinador treinado e calibrado previamente.

Expressão de citocinas inflamatórias locais (MULTIPLEX)

A concentração tecidual de IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, RANKL e OPG nas amostras do tecido cutâneo adjacente a calvária foi avaliada por ensaio multiplex (Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho - LACTAD/UNICAMP - Campinas/SP). As amostras de proteínas totais foram extraídas com RIPA Lysis Buffer reagente, 10x (Merck, Millipore) e

quantificadas pelo método BCA Protein Assay (Novagen, EMD Chemicals), de acordo com as instruções do fabricante. Para o ensaio multiplex, utilizou-se o Milliplex Kit (EMD Millipore), que fornece análise de diferentes analitos em um mesmo poço da placa, e o ensaio completo foi realizado de acordo com os protocolos de cada kit e as instruções do fabricante. Os resultados do ensaio foram normalizados dividindo-se pelos respectivos valores da proteína alvo obtidos na quantificação pelo método de ensaio de proteína BCA. Os dados gráficos foram expressos em fold-change.

Análise dos dados

Os dados foram submetidos aos testes de homogeneidade e distribuição usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, one-way ANOVA e o pós-teste de Tukey foram realizados para análise comparativa entre os grupos, e o teste t para comparar o nível de testosterona inicial e final, assim como para comparar o peso dos animais. Todas as análises foram realizadas usando o software de análises estatísticas GraphPad Prism 6. Todos os testes foram aplicados com um nível de confiança de 95% ($p < 0.05$). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

MATERIAL E MÉTODO (CAPÍTULO 5)

Animais

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (Processo CEUA/FOAR #20/2016). Sessenta ratos machos (*Rattus norvegicus* albino, linhagem Holtzman), de 11 a 12 meses de idade, foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos ($n = 10$ / grupo), mantidos a uma temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2$, umidade de 65-75% e um ciclo de luz controlado (12hluz-12h escuro), com ração e água disponíveis *ad libitum*. Os grupos e condições experimentais são mostrados na Figura A2.

Figura A2- Representação da distribuição de ratos por grupo experimental.

Grupos	Procedimentos nos testículos	1ª Reposição de Testosterona	2ª Reposição de Testosterona	Ligadura	Eutanásia
G1 (n=10)	SHAM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
G2 (n=10)	SHAM	NÃO	NÃO	SIM	SIM
G3 (n=10)	OQX	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
G4 (n=10)	OQX	NÃO	NÃO	SIM	SIM
G5 (n=10)	OQX	SIM	SIM	NÃO	SIM
G6 (n=10)	OQX	SIM	SIM	SIM	SIM

SHAM – Exposição e manipulação dos testículos, sem remoção; OQX - Orquiectomia total (exposição, manipulação e remoção dos testículos).

Fonte: Elaboração própria.

Orquiectomia

Resumidamente, quarenta ratos (n=10/grupo) sob condições estéreis receberam anestesia com ketamina (1 mL/kg) e xilazina (0.4 mL/kg), e em seguida incisão escrotal para remoção testicular bilateral. A incisão foi suturada com fio reabsorvível e os ratos receberam ketoflex (0,03 ml/rato, intramuscular) para alívio da dor pós-operatória, e uma combinação de sais de benzilpenicilina e estreptomicina (Pentabiótico/0,2 ml/rato, intramuscular). O procedimento sham foi realizado em 20 ratos (n = 10 / grupo), onde foi realizada exposição cirúrgica e a manipulação dos testículos (sem a dissecação e remoção) e a sutura. Após os procedimentos cirúrgicos os animais foram mantidos em gaiolas separadas para recuperação durante uma semana (Figura A2).

Reposição hormonal com testosterona

Trinta dias após a orquiectomia ou procedimento sham, 20 ratos (n = 10/grupo) receberam 62,5 mg/kg de peso corporal de undecanoato de testosterona (Nebido) por via intramuscular. No dia 60 (trinta dias após a primeira injeção de testosterona), uma segunda terapia hormonal foi realizada seguindo o mesmo procedimento, a fim de manter níveis fisiológicos de testosterona até o final do período experimental (Figura A2).

Indução da doença periodontal experimental

Sessenta e dois dias após a orquiectomia ou procedimento sham, 30 ratos (n = 10 / grupo) foram anestesiados como descrito acima. Uma ligadura de algodão 3.0 foi colocada bilateralmente em uma posição subgingival em torno dos primeiros molares inferiores para permitir a acumulação bacteriana, levando a inflamação e perda óssea. Os outros 30 animais não receberam ligaduras e serviram como controles saudáveis. As ligaduras foram mantidas por 15 dias, e ao final desse período todos os ratos foram eutanasiados (Figura A2).

Análise do nível sérico de testosterona

Amostras de sangue caudal foram coletadas de cada animal no início do experimento, antes do procedimento cirúrgico (baseline) e 3 dias pós-orquiectomia/cirurgia sham. Uma segunda e terceira coleta de sangue caudal foram realizadas em todos os animais, respectivamente 25 dias após a 1ª reposição da testosterona (RT) e após 48 horas após a 2ª RT. Uma coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca no momento do sacrifício. Cada amostra de soro foi analisada para os níveis totais de testosterona utilizando um imunoenensaio à base de quimioluminescência (Immulite 2000), no Laboratório de Análises Clínicas São Lucas em Araraquara-SP.

Eutanásia e coleta das amostras

Após completar os períodos experimentais, todos os ratos foram eutanasiados por aprofundamento anestésico, e as amostras coletadas. O tecido gengival em torno dos primeiros molares inferiores da hemi-mandíbula de 10 animais por grupo foi removido, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até a análise. As hemi-mandíbulas remanescentes foram fixadas em 10% de formol (pH 7,2) durante 48h e transferidas para álcool 70%.

Estereometria

Os espécimes foram submetidos ao processamento laboratorial de rotina (incluindo descalcificação em 0,5 mL de ácido etilenodiaminotetraacético-EDTA, pH 7,2 durante 6

semanas) e, posteriormente, incorporados em parafina em uma orientação espacial padronizada para obtenção de cortes semi-seriados de 5 μm de espessura no sentido vestibulo-lingual. Os cortes foram montados em lâminas de vidro e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E). Em seguida, para análise estereométrica, uma grade de 32.400 μm^2 com 9 \times 4 quadrados de 30 μm foi construída usando um software de gerenciamento/editor de imagem (Adobe Photoshop CS5) e sobreposto nas imagens digitais obtidas dos cortes histológicos. A região de interesse para a análise foi representada por toda a grade, que foi posicionada em uma área submarginal nas superfícies vestibular e lingual, sobre o tecido conjuntivo subjacente ao sulco gengival (a borda apical do epitélio juncional e a estrutura do dente foram usadas como limites superiores e laterais da grade, respectivamente). Um único examinador (LCS), previamente treinado e calibrado, realizou a análise estereométrica usando uma técnica de contagem de pontos. As seguintes estruturas observadas em cada ponto de interseção da grade foram registradas: células inflamatórias, fibroblastos, matriz extracelular e vasos sanguíneos, contados usando um corte histológico das hemi-mandíbulas de 5 animais/grupo. Para cada amostra, os valores obtidos das medidas de cada superfície foram obtidos e as médias e desvios padrão foram calculados. A presença de cada estrutura foi expressa como uma porcentagem da área total analisada.

Microtomografia computadorizada (μCT)

As hemi-mandíbulas de 5 animais/grupo foram examinadas por microtomografia computadorizada (μCT). As amostras foram escaneadas a uma resolução de 18 μm , 50kV, 500 Ma usando um filtro de atenuação de alumínio de 0,5 mm. O software CTan/CTvol foi utilizado para reconstrução, reorientação e análises tridimensionais das imagens reconstruídas. Em cada amostra foi determinada uma região de interesse padronizada (ROI) entre as raízes do primeiro molar, considerando o tecido ósseo proximal entre o 1º e 2º molares à mesial do 1º molar, inclusive as faces vestibular/lingual. Neste ROI padronizado determinou-se a fração do volume ósseo, utilizando um threshold padronizado para distinguir tecidos mineralizados e não

mineralizados. A porcentagem de tecido mineralizado correspondente às estruturas radiculares foi subtraída da fração do volume ósseo. A fração de volume ósseo/volume total (BV / TV) do ROI foi obtida e a porcentagem resultante era diretamente proporcional à extensão da reabsorção óssea inflamatória.

Análise da expressão de citocinas gengivais (ELISA)

Proteína total foi extraída das amostras de tecido gengival utilizando um tampão de lise comercialmente disponível (T-Per) suplementado com um coquetel de inibidores de protease. Os lisados de tecido gengival foram utilizados para a quantificação de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α utilizando-se kits de ensaio imunoenzimático (ELISA). A concentração total de proteína em cada amostra foi determinada pelo método de Lowry e utilizada para a normalização dos resultados obtidos no ELISA. Os dados foram expressos como fold-change em relação às concentrações de cada citocina nas amostras do grupo controle.

Análise dos dados

Os dados foram testados quanto à homogeneidade e distribuição normal usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste One-way ANOVA e pós-teste Tukey foram realizados para a comparação entre todos os grupos, e teste t para comparar um grupo com ligadura em uma determinada condição experimental com o grupo respectivo sem ligadura na mesma condição experimental. Todas as análises foram realizadas usando o software estatístico GraphPad Prism 6. Todos os testes foram aplicados com um nível de confiança de 95% ($p < 0.05$). Os dados foram expressos como média \pm DP.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Proc. CEUA nº 47/2014

Araraquara, 25 de maio de 2017.

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal – CEUA desta Faculdade, procedeu a análise do Relatório Parcial do projeto de pesquisa de sua responsabilidade intitulado ***“IMPACTO DE ANDRÓGENOS SOBRE O PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL E O MECANISMO DE REABSORÇÃO ÓSSEA”*** (Proc. CEUA nº 47/2014), e considerou-o APROVADO, bem como sua solicitação de prorrogação no prazo da pesquisa.

Lembramos que o Relatório Final deste projeto deverá ser entregue em SETEMBRO/2018.

Atenciosamente.

Carina A. F. Andrade
Prof. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA

Ao
Prof. Dr. LUIS CARLOS SPOLIDÓRIO
DD. Pesquisador Responsável
Departamento de Fisiologia e Patologia

Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA
Rua Humaitá nº 1.680 - Centro - CEP 14801-900 - Caixa Postal nº 731 - ARARAQUARA - SP
9º andar - fone (16) 3301-6459 / fax (16) 3301-6433 / e-mail: ceua@fao.usp.br - home page: <http://www.fao.usp.br>

ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Faculdade de Odontologia

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 20/2016 referente à pesquisa "IMPACTO DA TESTOSTERONA NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOINFLAMATÓRIA E DO TURNOVER DO TECIDO ÓSSEO NA PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA E NA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA DE FÊMUR EM MODELO EXPERIMENTAL EM RATOS" sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luis Carlos Spolidório está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pela legislação brasileira atualmente em vigor, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

CERTIFICATE

We certify that the protocolo 20/2016 referring to the research "Testosterone Impact on the modulation of the immunoinflammatory response and turnover of bone tissue in ligature - Induced periodontitis and femoral bone mineral density in an experimental model in rats" under responsibility Prof. Dr. Luis Carlos Spolidório in agreement with the nowadays specific Brazilian laws and was approved by the Araraquara Dental School-UNESP Ethical Committee for Animal Research (CEUA).

Araraquara, 28 de Novembro de 2017.

Prof. Dra. **CÁRINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE**

Carina A. S. Andrade
Coordenador da CEUA/FOAr/UNESP



ANEXO C - Documento Comprobatório (Submissão do artigo)

Journal of Periodontology



Long-term testosterone depletion attenuates inflammatory bone resorption in the ligature-induced periodontal disease model

Journal:	<i>Journal of Periodontology</i>
Manuscript ID:	JOP-17-0457.R1
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	25-Sep-2017
Complete List of Authors:	Gonçalves, Vinicius; Araraquara School of Dentistry, University of São Paulo State, UNESP, Department of Diagnosis and Surgery Cabrera Ortega, Adriana; Araraquara School of Dentistry, University of São Paulo State, UNESP, Department of Diagnosis and Surgery Steffens, Joao Paulo; Universidade Federal do Parana Setor de Ciencias da Saude, Department of Stomatology Spolidorio, Denise; Univ. Estadual Paulista-UNESP, Araraquara, São Paulo, Department of Physiology and Pathology Rossa Jr, Carlos; Dental School, University of State of São Paulo, Department of Diagnosis and Surgery Spolidorio, Luis Carlos; Araraquara School of Dentistry, University of São Paulo State, UNESP, Department of Physiology and Pathology; Araraquara School of Dentistry, University of São Paulo State, UNESP
Key Words:	Periodontitis, Bone biology, Endocrinology

SCHOLARONE™
Manuscripts

ANEXO D - Documento Comprobatório (Aceite do artigo)

Author Dashboard

2 Manuscripts I Have Co-Authored >

[Start New Submission](#) >

[Legacy Instructions](#) >

[5 Most Recent E-mails](#) >

[English Language Editing Service](#) >

Manuscripts I Have Co-Authored

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
AE: Reddy, Michael EOS: Daw, Julie <ul style="list-style-type: none"> • Accept (28-Sep-2017) • Awaiting Production Checklist Copyright Form Completion submitted (12-Oct-2017) - view	JOP-17-0457.R1	Long-term testosterone depletion attenuates inflammatory bone resorption in the ligature-induced periodontal disease model View Submission Submitting Author: Spolidorio, Luis Carlos Cover Letter/Comments/Conflict of Interest Forms	25-Sep-2017	25-Sep-2017
AE: Reddy, Michael EOS: Daw, Julie EOS: Wilson, Bethanne <ul style="list-style-type: none"> • Major revisions necessary (04-Sep-2017) • a revision has been submitted Conflict of Interest Form Completion submitted (31-Jul-2017) - view	JOP-17-0457	Long-term testosterone depletion attenuates inflammatory bone resorption in the ligature-induced periodontal disease model View Submission Submitting Author: Spolidorio, Luis Carlos	25-Jul-2017	25-Jul-2017

ANEXO E - Documento Comprobatório (Autorização do periódico)

De: Lia Hudson <lia@perio.org>
 Enviado: terça-feira, 31 de outubro de 2017 13:59
 Para: viniciusodonto2007@hotmail.com
 Assunto: RE: Authorization request

Hello:

You have permission from the American Academy of Periodontology, as copyright holder for the *Journal of Periodontology*, to include your paper cited below in your thesis materials.

This permission is granted solely for the purpose defined above and with the understanding that your thesis will be printed and placed online in the university's repository.

Please let us know if we can be of further assistance.

<https://outlook.live.com/mail/?realm=hotmail.com#/?id=AQQkADAwATY3ZmYAZS05ZTlyAC01Y2UwLTAwAIDwMAoAEAASpWbGILZT6bOelQ9xATH>

1/2

05/12/2017

Email - Vinicius de P. Gonçalves - Outlook

Lia Hudson
 Sr. Production and Circulation Manager

From: Vinicius de P. Gonçalves [<mailto:viniciusodonto2007@hotmail.com>]
 Sent: Tuesday, October 31, 2017 6:43 AM
 To: Jerry Eberle <jerry@perio.org>
 Subject: Authorization request

Dear Jerry,

Please, I would like to request information about the authorization.

The recently accepted article for publication in Journal of Periodontology "Long-term testosterone depletion attenuates inflammatory bone resorption in the ligature-induced periodontal disease model" is the result of research developed during my PhD.

Therefore, I must attach the article in the PhD thesis. However, the thesis will be made available in the repository of University of São Paulo State (UNESP), the university where I developed the PhD.

How do I proceed with copyright? Is it possible for the journal to issue a letter of authorization to attach the article to the thesis?

Sincerely,

Vinicius de Paiva Gonçalves.

Vinicius de Paiva Gonçalves
 Especialista em Periodontia
 Mestre em Odontologia - Área de Periodontia
 Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Área de Periodontia
 Departamento de Diagnóstico e Cirurgia - Periodontia / Cel.: (16) 981004342 / (34) 91176337
 Departamento de Fisiologia e Patologia
 Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Faculdade de Odontologia / UNESP-FOAr

CONFIDENTIALITY NOTICE: This e-mail transmission, and any attachments, is intended only for the use of the individual or entity named above and may contain information that is confidential, privileged and exempt from disclosure under applicable law. If you are not the intended recipient, you are hereby notified that any disclosure, copying, distribution or use of any of the information contained in this transmission is strictly PROHIBITED.

<https://outlook.live.com/mail/?realm=hotmail.com#/?id=AQQkADAwATY3ZmYAZS05ZTlyAC01Y2UwLTAwAIDwMAoAEAASpWbGILZT6bOelQ9xATH>

2/2

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 27 de março de 2020.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 27 de março de 2018.

VINICIUS DE PAIVA GONÇALVES