



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



LUÍS CARLOS LEAL SANTANA

**IMPACTO DE ANDRÓGENOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO E ATIVIDADE DE
FIBROBLASTOS E CÉLULAS EPITELIAIS EM CULTURA CELULAR**

Araraquara

2016



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



LUÍS CARLOS LEAL SANTANA

**IMPACTO DE ANDRÓGENOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO E ATIVIDADE DE
FIBROBLASTOS E CÉLULAS EPITELIAIS EM CULTURA CELULAR**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia - Área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio

Araraquara

2016

Santana, Luís Carlos Leal

Impacto de andrógenos sobre a proliferação e atividade de fibroblastos e células epiteliais em cultura celular / Luís Carlos Leal Santana.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

78 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidório

1. Fibroblastos 2. Hormônios esteróides gonadais 3. Androgênios
I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

LUÍS CARLOS LEAL SANTANA

**IMPACTO DE ANDRÓGENOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO E ATIVIDADE DE
FIBROBLASTOS E CÉLULAS EPITELIAIS EM CULTURA CELULAR**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio

2º Examinador: Profa. Dra. Ticiania Sidorenko de Oliveira Capote

3º Examinador: Profa. Dra. Thallita Pereira Queiroz

4º Examinador: Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza

5º Examinador: Prof. Dr. Rogerio Margonar

Araraquara, 21 de março de 2016.

DADOS CURRICULARES

LUÍS CARLOS LEAL SANTANA

NASCIMENTO: 18/10/1987 – MANAUS/AM

FILIAÇÃO: LUIZ CARLOS LOPES SANTANA
ANA BATISTA LEAL

2007 - 2011

Graduação em Odontologia
Universidade Paulista – UNIP, Manaus, Amazonas.

2011 - 2013

Especialização em Implantodontia
Associação Brasileira de Cirurgiões-Dentistas – ABCD, Manaus, Amazonas.

2014 - 2016

Mestrado em Odontologia – Área de Concentração: Periodontia
Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP, Araraquara, São Paulo.

DEDICATÓRIA

Com todo amor, dedico este trabalho àqueles que me presentearam com a vida: Luiz Carlos Lopes Santana e Ana Batista Leal.

Palavras são insuficientes para expressar o quanto você foi e continua sendo fundamental para mim. Foi você quem me estendeu a mão. Que me deu a oportunidade de ser tudo o que sou hoje. Que inúmeras vezes confortou as minhas dores. Que me amparou e me reergueu quando pensei em sucumbir. Foi você que, com a sua fala calma e lúcida, me guiou pela estrada da vida. Que, ao me mostrar a diferença entre o certo e o errado, moldou meu caráter. Você me mostrou que a vida é o que temos de mais importante e que, portanto, não vale à pena vive-la pela metade. Que dar é tão gratificante quanto receber. Que por mais instruídos, sempre teremos algo novo a aprender. Você é o meu melhor amigo e o meu maior herói. Metade de mim é você, e a outra metade tenta te copiar. Eu te amo para sempre pai.

“Mãe”...

Uma palavra mágica que move todos os corações. Por muito tempo, a sua falta foi sentida. Por muito tempo, tentei encontra-la. Por muito tempo me senti sozinho. Mas como dizem: “águas passadas não movem moinhos”. Graças a Deus, a vida se encarregou de colocar tudo no seu devido lugar. E o seu lugar é, e sempre vai ser no meu coração. Você me deu tudo que sempre precisei, mas principalmente amor, carinho e cuidado. Hoje, compartilho com você não a minha, mas a nossa vitória, pois jamais teria chegado até aqui sem o seu apoio incondicional. Te amo para sempre mãe.

Sou completo graças a vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Embora na vida haja tantos desencontros, agradeço a Deus por ter encontrado o seu sorriso em meio à multidão. Você que me conhece como poucos. Que compartilha dos mesmos planos e objetivos. Que não só acompanha, mas influencia diretamente o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Obrigado por fazer parte da minha vida. Obrigado por me permitir fazer parte da sua. Obrigado por estar ao meu lado, me apoiando em todos os momentos, seja na alegria ou na tristeza, na saúde ou na doença. Com amor e admiração, meus eternos agradecimentos a você **Camila Cristina de Foggi**.

Pelo carinho, cuidado, pela amizade e por todas as oportunidades profissionais que agradeço a minha sogra, **Dra. Susi Fioraneli**, a quem tenho apreço imensurável. Você é exemplo de humildade, sinceridade, decência, sabedoria e conduta. Obrigado por todo suporte e por me permitir fazer parte da sua vida. Meus eternos agradecimentos.

À minha querida cunhada **Sophia Moura**, a quem tenho enorme carinho e consideração. Obrigado por tornar os meus dias muito mais alegres.

Casa, não é apenas o lugar em que moramos. Muito mais que isso, é onde alma e coração encontram a paz e o conforto necessários para descansar. A vocês, muito obrigado por diversas vezes me fazer sentir em casa.

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor e orientador que estimo sobremaneira **Dr. Luis Carlos Spolidorio**, sem o qual seria impossível a realização deste sonho. Obrigado pela confiança, ensinamentos, e por não ter medido esforços para a realização deste trabalho. Jamais chegaria a este momento sem as suas contribuições.

Aos **Prof. Dr. João Paulo Steffens**, **Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza** e **Dra. Fernanda Gonçalves Basso** que contribuíram de forma substancial e direta para o meu crescimento profissional. Obrigado pelos ensinamentos, colaboração, pelo direcionamento em pesquisa, pela paciência e co-orientação neste trabalho. Seria impossível chegar até aqui sem as suas devidas contribuições.

Ao Governo do Estado do Amazonas, à população amazonense e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – **FAPEAM**, por subsidiarem a minha formação profissional. Processo FAPEAM nº **19894.483.36583.10102014**.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP, nas pessoas da atual diretora **Profa. Dra. Andréia Affonso Barretto Montandon** e vice-diretora **Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato**.

Ao **Jonleno Coutinho Paiva Pitombo** pela troca de conhecimentos, por toda a ajuda que foi necessária para chegar até aqui, por colaborar com o meu crescimento profissional. Ambos sabemos o esforço e o empenho que foi colocado em cima deste trabalho. Obrigado por, acima de tudo, ter me oferecido a sua amizade. Saiba que estarei sempre de pé, na primeira fileira, te aplaudindo.

Ao **Prof. Fernando Cintra Magalhães**, pelos ensinamentos, pela troca de conhecimentos, pela amizade e por diversas vezes colaborar com o meu desenvolvimento profissional.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa** e **Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio** por terem cedido o uso do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais e o Laboratório de Cultura de Células e Microrganismos para a realização dos experimentos.

Aos professores que estimo sobremaneira: **Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos, Dr. Joni Augusto Cirelli, Dra. Adriana Marcantonio, Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga, Dr. Elcio Marcantonio Jr., Dra. Silvana Regina Perez Orrico, Dr. Carlos Rossa Jr.**

Àqueles que me recepcionaram em Araraquara de braços abertos: **Tiago Silva Fonseca, Vinicius de Paiva Gonçalves, Miriam Grazielle Magro e Ana Carolina Venção.**

A todos os amigos e colegas de turma e pós-graduação, em especial **Jonleno Coutinho Paiva Pitombo, Romerito Lins, Hércules Dias, Dayane Brandão, Prof. Fernando Cintra Magalhães.**

Aos meus irmãos: **Juliana Leal Santana, Luís Wilson K. F. Santana, Helen B. F Santana e Elidiane Carvalho Santana** que sempre torceram e apoiaram o meu crescimento profissional e a minha vinda a Araraquara.

Ao corpo técnico-administrativo da Pós-Graduação: **Cristiano Afonso Lamounier e José Alexandre Garcia.** Obrigado por toda a ajuda, orientação e suporte necessários para completar esta jornada.

Ao corpo técnico-administrativo das Ciências Biomorfológicas, em especial **José Antônio Sampaio Zuanon, Juliana Pirola Garcia, Silvana Aparecida Malavolta e Carla Molina de Alencar.**

Ao corpo técnico-administrativo do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, em especial **Claudinha, Leandro, Isa e Su.**

Aos servidores que me deixaram entrar nas pendências desta faculdade para o cumprimento de minhas obrigações: **Sr. José Fernando, Sr. João, Paulinho, Romarinho e Ruth.**

A todos, muito obrigado.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes” (Martín Luther King).

Santana LCL. Impacto de andrógenos sobre a proliferação e atividade de fibroblastos e células epiteliais em cultura celular [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP; 2016.

RESUMO

Hormônios esteroides sexuais participam de diversos eventos celulares e moleculares, e exercem influência sobre o epitélio e tecido conjuntivo do periodonto. A testosterona (T), principal hormônio androgênico, pode ser convertida em estradiol (E₂) pela ação da enzima aromatase, ou em di-hidrotestosterona (DHT) pela ação da enzima 5 α -redutase. Para elucidar o impacto de andrógenos sobre as células que compõem os tecidos conjuntivo e epitelial, fibroblastos e queratinócitos foram avaliados em relação aos efeitos de diferentes concentrações de T e DHT, além da exposição ao anastrozol (ANA), flutamida (FLU), fulvestranto (FUL), e às associações farmacológicas T+ANA, T+FLU e T+FUL. Os resultados do presente estudo indicaram que, de modo geral, hormônios esteroides androgênicos exercem efeitos opostos sobre eventos celulares de fibroblastos gengivais humano e células epiteliais HaCaT em cultura celular. Enquanto a T e a DHT agem promovendo o aumento da proliferação e atividade de fibroblastos, a exposição de células HaCaT a estes mesmos andrógenos resulta em inibição ou exiguidade do crescimento celular, atividade metabólica ou a capacidade de repovoamento da área de arranhão *in vitro*. Além disso, o tratamento farmacológico com ANA, FLU, FUL, e suas respectivas associações à T, parece influenciar eventos celulares de fibroblastos gengivais humano e células epiteliais HaCaT *in vitro*.

Palavras-chave: Fibroblastos, Hormônios esteróides gonadais, Androgênios.

Santana LCL. Androgens impact on gingival fibroblasts and epithelial cells proliferation and activity in cell culture [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

Sex steroid hormones take part in different cellular and molecular process and exert their functions on the epithelium and connective tissue of the periodontium. Testosterone (T), the main androgenic hormone can be converted to estradiol (E2) through the aromatase enzyme action, or into dihydrotestosterone (DHT) by 5 α -reductase activity. To elucidate the impact of androgens on the cells that constitute the connective and epithelial tissues, fibroblasts and keratinocytes were evaluated under the effects of different concentrations of T and DHT, besides to be both exposed to anastrozole (ANA), flutamide (FLU), fulvestrant (FUL), and the pharmacological associations T+ANA, T+FLU and T+FUL. The results of this study indicated that, in general, androgenic steroid hormones exert opposite effects on cellular events of human gingival fibroblasts and epithelial cells. While androgens act stimulating gingival fibroblasts, in HaCaT cells androgens promotes a shortage or inhibition of cell growth and activity. Furthermore, pharmacological treatment with ANA, FLU, FUL, and their associations to T, appears to influence cellular events of human gingival fibroblasts and HaCaT cells in vitro.

Keywords: Fibroblasts, Gonadal steroid hormones, Androgens.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Síntese e Controle de Hormônios Esteroides Gonadais	13
2.2 Receptores Hormonais, Antiandrógenos, Antiestrógenos	14
2.3 Mecanismo de Ação da Enzima 5 α -redutase	17
2.4 Mecanismo de Ação da Aromatase e de Inibidores da Aromatase	18
2.5 Efeitos Biológicos de Hormônios Esteroides Sexuais Sobre os Tecidos Conjuntivo e Epitelial	19
2.6 Papel de Hormônios Esteroides Sexuais Sobre os Tecidos Periodontais	20
2.7 Efeitos de Hormônios Esteroides Sexuais Sobre Fibroblastos e Células Epiteliais	21
2.8 Colágeno e Ácido Hialurônico	23
3 PROPOSIÇÃO	25
4 MATERIAL E MÉTODO	26
4.1 Cultura de Células	27
4.2 Grupos Experimentais	27
4.3 Ensaio de Proliferação Celular	28
4.4 Ensaio de Atividade Metabólica	30
4.5 Ensaio de Arranhão In Vitro - “Scratch Assay”	30
4.6 Análise da Síntese de Ácido Hialurônico	32
4.7 Análise dos Resultados	32
5 RESULTADO	34
5.1 Fibroblastos Gengivais (hGF)	34
5.2 Células Epiteliais (HaCaT)	46
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	67
 REFERÊNCIAS	 68
ANEXO A	78

1 INTRODUÇÃO

A síntese e o controle de hormônios esteroides gonadais ocorre por meio de um processo autorregulador via eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, por meio do estímulo do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (Mawhinney, Mariotti⁵⁰, 2013). Com o passar da idade, constata-se que a diminuição da síntese de GnRH é acompanhada pela redução dos níveis séricos de testosterona, indicando o encerramento do período reprodutivo no homem (Gruenewald et al.²⁷, 2000; Keenan, Veldhuis³⁸, 2004; Zhang et al.⁹⁹, 2013).

Níveis subfisiológicos de testosterona, em geral, menor que 300 ng/dL em adultos (Bhasin et al.⁸, 2010), têm sido associados à letargia, depressão, diminuição da libido, diminuição da massa muscular e óssea (Liu et al.⁴⁶, 2004), disfunção erétil (Zitzmann et al.¹⁰¹, 2006), resistência à insulina, osteopenia (Veldhuis⁹², 2008), osteoporose, síndrome metabólica e diabetes mellitus do tipo 2 (Yeap⁹⁸, 2009). Por outro lado, os efeitos de níveis suprafisiológicos de testosterona, maior que 700 ng/dL (Bhasin et al.⁸, 2010), podem incluir alterações cardiovasculares (Kanayama et al.³⁷, 2008), disfunção sexual, toxicidade às células hepáticas (Welder et al.⁹⁵, 1995), além de efeitos psíquicos, somáticos e comportamentais (Clark, Henderson¹⁶, 2003; Van Amsterdam et al.⁹¹, 2010). Logo, a manutenção de níveis fisiológicos de GnRH e hormônios esteroides gonadais mostra-se favorável para o equilíbrio das funções metabólicas e do sistema imune (Tanriverdi et al.⁸⁶, 2003).

Apesar das ações de hormônios esteroides sexuais sobre as células residentes no tecido periodontal ainda não terem sido completamente elucidadas (Mariotti, Mawhinney⁴⁷, 2013), um estudo clínico caso-controle reportou o aumento da área gengival causado pelo uso prolongado de esteroides androgênicos anabolizantes, por atletas levantadores de peso (Ozcelik et al.⁶², 2006). Recentemente, o nosso grupo evidenciou que tanto níveis subfisiológicos quanto suprafisiológicos de testosterona foram responsáveis pelo espessamento da área gengival, sugerindo o papel regulador deste hormônio sobre as células que compõem os tecidos conjuntivo e epitelial (Steffens et al.⁷⁸, 2012).

Assim, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a influência de andrógenos sobre eventos celulares e moleculares de fibroblastos e células epiteliais em cultura celular.

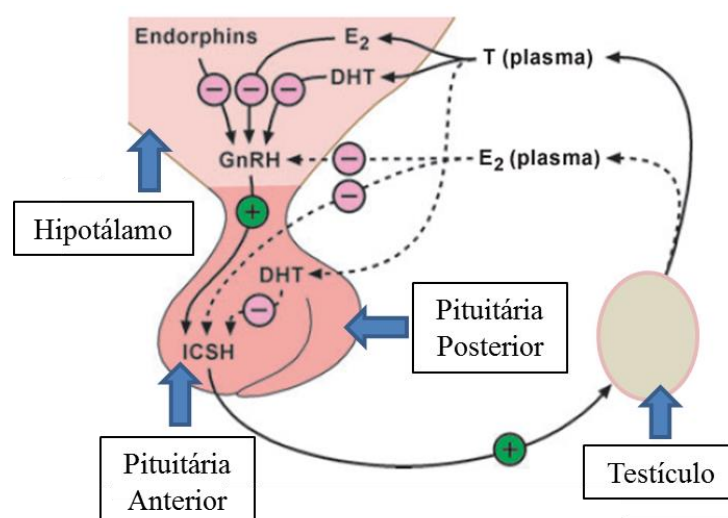
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Síntese e Controle de Hormônios Esteroides Gonadais

O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) representa a classe de neuropeptídeos que desempenham papel regulador na cascata hormonal reprodutiva (Veldhuis⁹³, 1999; Millar et al.⁵¹, 2004; Ubuka et al.⁹⁰, 2013). Produzido e controlado por meio de um sistema dinâmico autorregulador via eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, o GnRH é responsável por estimular a produção de hormônios esteroides gonadais, via ação das gonadotrofinas hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), respectivamente, sobre o folículo ovariano e as células intersticiais de Leydig nos testículos. Por conseguinte, a testosterona e o estradiol produzidos por estímulos gonadotróficos exercem papel regulador no processo de síntese do GnRH (Figura 1), além de exercerem suas funções em diferentes processos fisiológicos do organismo (Mariotti, Mawhinney⁴⁷, 2013; Mawhinney, Mariotti⁵⁰, 2013).

Entre os andrógenos, a testosterona é o principal hormônio androgênico, e pode ser convertida em estradiol (E₂) pela ação da enzima aromatase, ou em di-hidrotestosterona (DHT), andrógeno não-aromatizável, pela ação da enzima 5 α -redutase (Sinnesael et al.⁷⁴, 2011; Mariotti, Mawhinney⁴⁷, 2013).

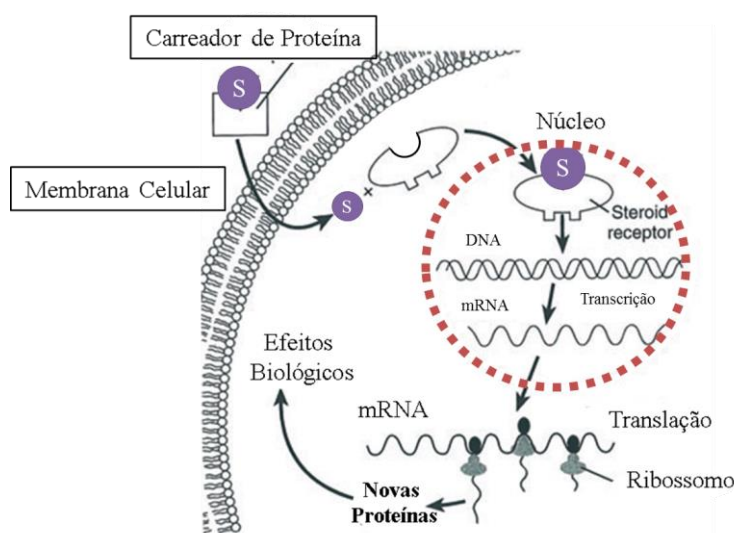
Figura 1 - Controle da síntese de hormônios sexuais via eixo hipotálamo-hipófise-gonadal no gênero masculino: T- testosterona; E₂- estradiol; DHT- di-hidrotestosterona; GnRH- hormônio liberador de gonadotrofinas; ICSH- hormônio estimulador de células intersticiais.



Autor: Adaptado de Mawhinney, Mariotti⁵⁰, 2013.
 Fonte: Periodontol 2000. 2013; 61(1): 232-51.

De modo geral, hormônios esteroides sexuais exercem papel central na reprodução humana, na diferenciação do trato reprodutor, no desenvolvimento do esqueleto e da musculatura esquelética, na homeostase óssea, além de regularem processos metabólicos nas glândulas salivares, no fígado e nos rins (Mooradian et al.⁵³, 1987; Shiau et al.⁷¹, 2014). Porém, para que exerçam ação, é fundamental sua ligação a receptores intracelulares, presentes no citoplasma e no núcleo celular, de forma a desencadear uma sequência de eventos genômicos responsáveis pela síntese de proteínas que exercem seus efeitos biológicos em diferentes células e tecidos-alvo (Mariotti, Mawhinney⁴⁷, 2013) (Figura 2).

Figura 2 - Mecanismo de ação de hormônios esteroides gonadais: S- hormônio esteroide gonadal; DNA- ácido desoxiribonucleico; mRNA- ácido ribonucleico mensageiro.



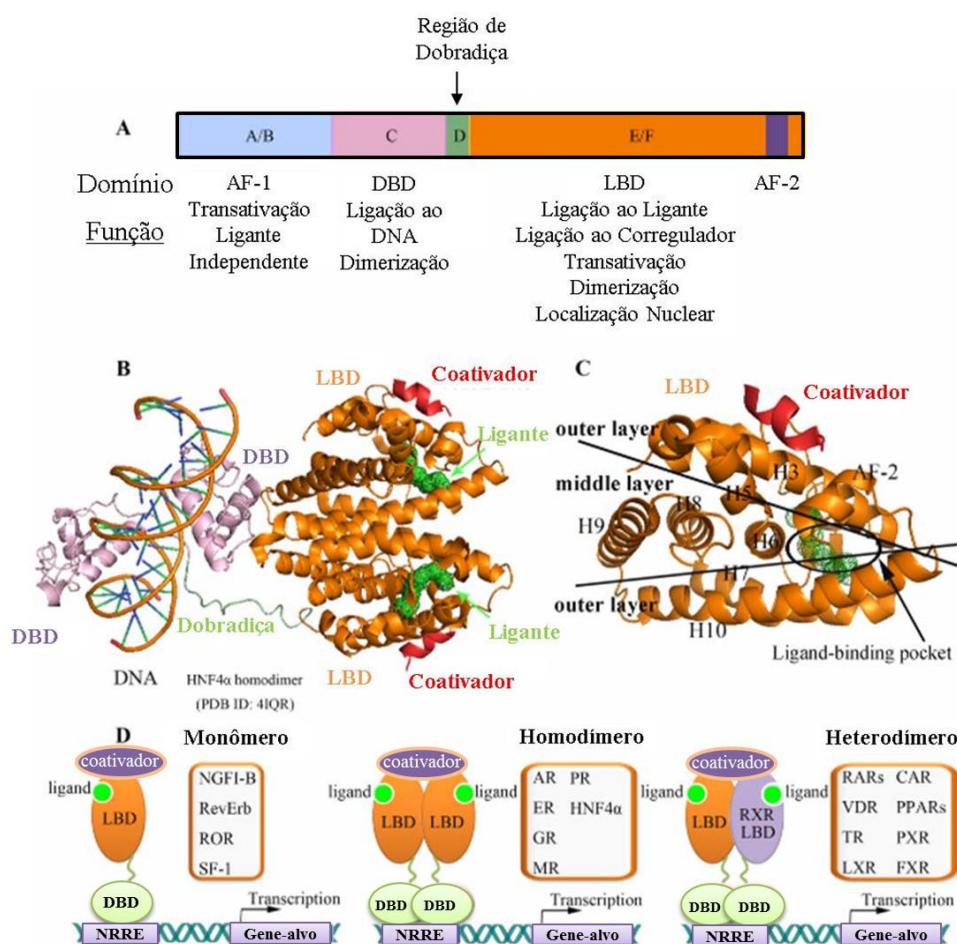
Autor: Adaptado de Mariotti, Mawhinney⁴⁷, 2013.
 Fonte: Periodontol 2000. 2013; 61(1): 69-88.

2.2 Receptores Hormonais, Antiandrógenos, Antiestrógenos

Receptores de andrógeno (AR), progesterona (PR) e de estrógenos- α e - β (ER- α , ER- β) são expressos por diversas células e constituem a classe de receptores nucleares hormonais (Bläuer et al.¹⁰, 1991; Liang et al.⁴⁴, 1993; Wilson, Mcphaul⁹⁶, 1996; Enmark et al.²¹, 1997). Os receptores nucleares compartilham similaridades estruturais, e podem ser divididos em três grupos: 1) receptores hormonais; 2) receptores órfãos; e 3) receptores órfãos adotados. Estes receptores possuem quatro regiões: A região A/B (domínio N-terminal de ativação da função

1; AF-1), a região C (domínio de ligação ao DNA; DBD), a região D (região de dobradiça), e região E/F (domínio de ligação ao ligante; LBD), sendo as regiões C e E/F as mais conservadas. A ligação específica de hormônios esteroides sexuais à região LBD de seus respectivos receptores hormonais gera o recrutamento de corretores da transcrição responsáveis por ativar a indução ou repressão de genes-alvo (Mariotti, Mawhinney⁴⁷, 2013; Yang et al.⁹⁷, 2014) (Figura 3). Estudos têm demonstrado que a expressão do AR pode variar entre os diferentes tecidos humanos (Wilson, Mcphaul⁹⁶, 1996) e até mesmo, entre diferentes espécies de roedores (Jahan et al.³⁶, 2015).

Figura 3 - Organização estrutural e funcional de receptores nucleares. **A**- estrutura comum ilustrando o domínio *N*-terminal ativador da função 1 (região A/B), que regula a ativação transcricional independente do ligante; o domínio de ligação ao DNA (DBD), que dita a resposta específica de reconhecimento do elemento (região C); a região de dobradiça (região D), que estabelece a ligação entre o DBD e o LBD (região E/F). **B**- estrutura multi-domínio do complexo HFN4- α /DNA. A estrutura do homodímero fator nuclear de hepatócitos- α (HFN4- α) inclui DBD (rosa), dobradiça (verde), LBD (laranja) formando um complexo com a sequência de DNA (à esquerda) e o ligante (pontos verdes). **C**- ampliação do monômero LBD HFN4- α ilustrando uma estrutura de três camadas “sanduíche”. **D**- regulação metabólica ilustrando que o complexo de ligação aos receptores nucleares promove o recrutamento de proteínas co-ativadoras responsáveis por aumentar a atividade de transcrição gênica. Receptores nucleares ligam-se à molécula de DNA como monômeros, homodímeros (receptores hormonais), e heterodímeros.



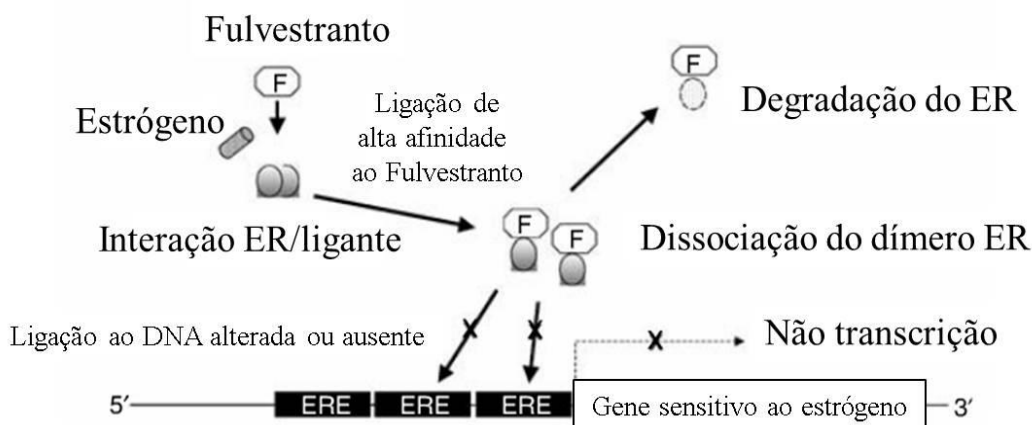
Autor: Adaptado de Yang et al.⁹⁷, 2014.

Fonte: Mar. Drugs. 2014; 12(2): 601-635.

Entretanto, a inibição dos receptores de andrógenos (AR) e de estrógeno (ER) pode ser mediada, respectivamente, por antiandrógenos e antiestrógenos. O fulvestranto, antagonista do ER, age rompendo a dimerização e a localização nuclear deste receptor, bloqueando a atividade de transcrição gênica, acelerando a degradação do ER. Logo, o fulvestranto é

responsável por inibir a atividade de genes regulados por estrógenos, como aqueles associados a neoplasias (Osborne et al.⁶¹, 2004) (Figura 4). Por outro lado, a flutamida, um antiandrógeno não-esteroidal, compete com andrógenos pelo sítio de ligação ao AR, e seus mecanismos estruturais de inibição gênica ainda não foram esclarecidos (Tan et al.⁸⁵, 2015).

Figura 4 - Mecanismo de ação do fulvestranto que compete com estrógenos pelo sítio de ligação à região LBD do receptor de estrógeno, regulando a expressão gênica a nível transcricional. ERE- elemento responsivo ao estrogênio; ER- receptor de estrógeno; F- fulvestranto.



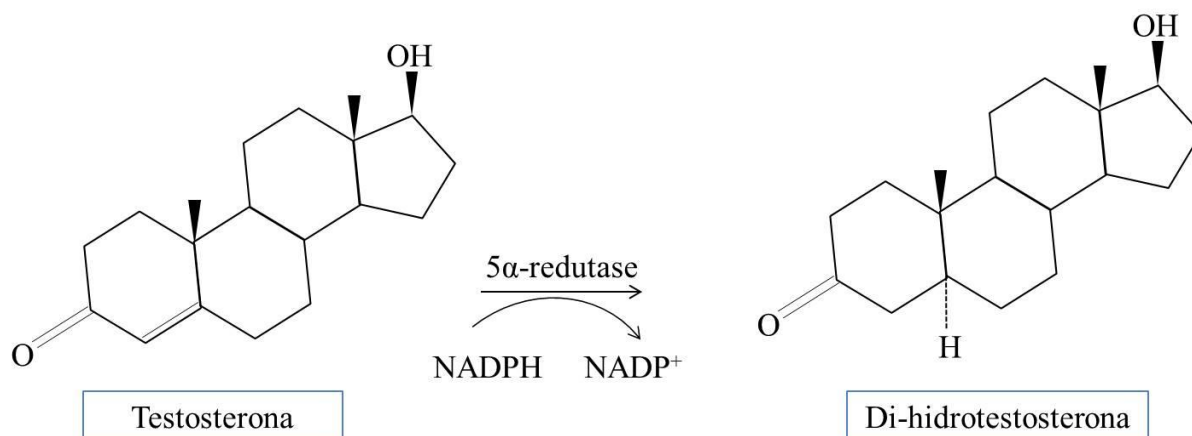
Autor: Adaptado de Osborne et al.⁶¹, 2004
 Fonte: Br J Cancer. 2004; 90(1): S2-6.

2.3 Mecanismo de Ação da Enzima 5 α -Redutase

Codificadas, respectivamente, pelos genes SRD5A1 e SRD5A2, as enzimas 5 α -redutase do tipo I e do tipo II atuam na conversão de testosterona em DHT, andrógeno não-aromatizável e metabolicamente mais ativo que o seu precursor. A isoenzima do tipo I é mais comumente expressa por fibroblastos da derme, queratinócitos da epiderme e foliculares, glândulas sudoríparas, e glândulas sebáceas da pele, enquanto que a isoenzima do tipo II é mais comumente expressa na próstata, epidídimo, vesícula seminal, e tecidos genitais (Li et al.⁴², 1995; Aggarwal et al.¹, 2010). Além disso, ação da enzima 5 α -redutase tem sido observada na linhagem HaCaT de células epiteliais (Altenburger, Kissel³, 1999) e em fibroblastos gengivais (Soory, Virdi⁷⁶, 1998). A redução de testosterona em DHT envolve um mecanismo de ação complexo entre a enzima 5 α -redutase, fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) e testosterona, que resulta em reduções seletivas nas

regiões dos carbonos 4 e 5 do anel aromático da testosterona (Aggarwal et al.¹, 2010) (Figura 5).

Figura 5 - Mecanismo de ação da enzima 5 α -redutase, responsável pela conversão de testosterona em DHT.



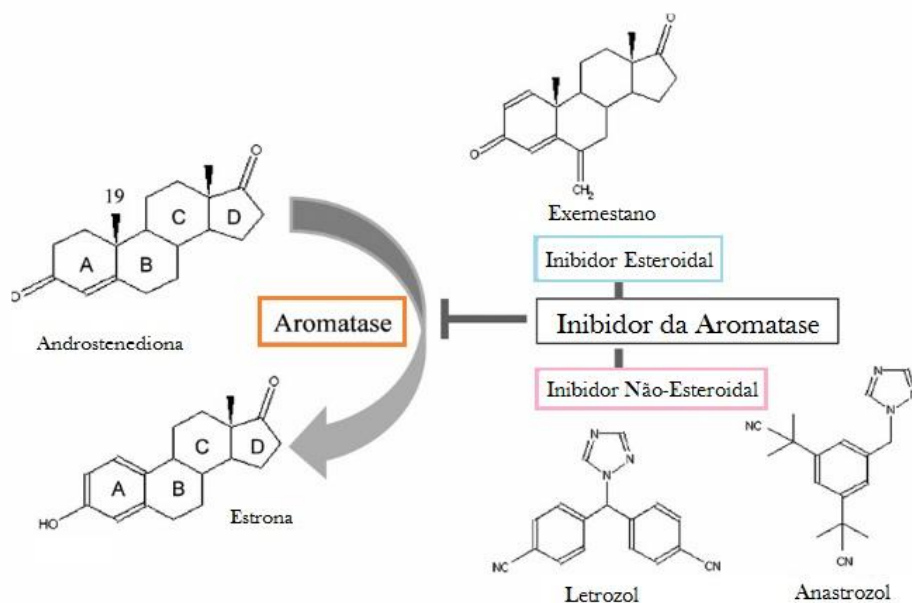
Autor: Adaptado de Aggarwal et al.¹, 2010.
 Fonte: Steroids. 2010; 75(2): 109-53.

2.4 Mecanismos de Ação da Aromatase e de Inibidores da Aromatase

O entendimento da ação biológica promovida pela enzima aromatase contribuiu para o desenvolvimento racional de fármacos com ação molecular, para o tratamento de neoplasias (Santen et al.⁷⁰, 2009). Pertencente à grande família do citocromo P450, o gene CYP19A1, presente em múltiplos tecidos, encontra-se no *locus* cromossômico 15q21.2, sendo o responsável pela codificação da enzima aromatase (Simpson⁷³, 2003), expressa por diversos tipos celulares como osteoblastos, osteoclastos (Nawata et al.⁵⁸, 1995) e fibroblastos da pele (Harada³¹, 1992). Responsável pela conversão de andrógenos em estrógenos (Chumsri et al.¹⁴, 2011; Hong et al.³⁴, 2011), a enzima aromatase representa a principal via extraglandular para a síntese de estrógenos, sendo esta via importante para a manutenção deste hormônio a níveis fisiológicos, principalmente em mulheres pós menopausa (Santen et al.⁷⁰, 2009). Entre os inibidores da enzima aromatase, o exemestano possui estrutura química similar aos andrógenos, e portanto, representa um inibidor esteroidal de ligação irreversível, causando inibição permanente desta proteína. Alternativamente, o letrozol e o anastrozol representam a classe de inibidores não-esteroidais, que competem com andrógenos pelo sítio de ligação à

enzima aromatase, possuindo um grupamento funcional triazol, responsável por modificar as propriedades catalíticas desta mesma enzima (Figura 6) (Hong et al.³⁴, 2011).

Figura 6 - Mecanismos de ação da enzima aromatase e dos inibidores esteroidal e não-esteroidais da enzima aromatase.



Autor: Adaptado de Hong et al.³⁴, 2011.

Fonte: Steroids. 2011; 76(8): 802-6.

2.5 Efeitos Biológicos de Hormônios Esteroides Sexuais Sobre os Tecidos Conjuntivo e Epitelial

Os efeitos de andrógenos e estrógenos sobre o tecido conjuntivo e epitelial têm sido elucidados em modelos de reparo tecidual, onde a ovariectomia, responsável pela diminuição dos níveis de estrógeno, aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) e interleucina-6 (IL-6), promove a diminuição da síntese de proteínas da matriz, diminuição da contração e da reepitelização de feridas cutâneas, além do atraso no processo de cicatrização tecidual, sendo estes traços revertidos pela administração de estrógeno (Pirilä et al.⁶⁶, 2002; Ashcroft et al.⁵, 2003; Mills et al.⁵², 2005; Romana-Souza et al.⁶⁹, 2014). Em contrapartida, foram demonstrados os efeitos adversos de andrógenos na cicatrização de feridas cutâneas, devido, em parte, à conversão de testosterona em DHT pela ação da enzima 5 α -redutase,

sendo que o bloqueio farmacológico desta enzima acelera o processo de reparo tecidual e diminui os níveis de IL-6 tecidual (Gilliver et al.²³, 2006; Gilliver et al.²⁴, 2009). Corroborando com os estudos in vivo realizados por Gilliver et al.²³ (2006) e Gilliver et al.²⁴ (2009), um estudo em humanos demonstrou que níveis elevados de testosterona em adultos jovens (7.46 ± 21 ng/mL em homens; 2.64 ± 31 ng/mL em mulheres) estiveram associados ao processo de reparo tecidual tardio na região da mucosa oral do palato, sendo este efeito ineficiente em homens idosos (50-88 anos), além de exercer o efeito oposto em mulheres idosas (50-88 anos, pós-menopausa) (Engeland et al.²⁰, 2008). A relevância dos efeitos biológicos mediados pelo receptor de andrógeno foi observada em camundongos transgênicos, em que o silenciamento genético do receptor de andrógeno (ARKO) promoveu resultados semelhantes à orquiectomia e à inibição farmacológica do receptor de andrógeno por flutamida, estimulando o processo de reparo tecidual, a deposição de colágeno, a diminuição do infiltrado de células inflamatórias e expressão tecidual de IL-6 e TNF- α (Ashcroft, Mills⁴, 2002; Lai et al.⁴⁰, 2009; Romana-Souza et al.⁶⁹, 2014).

Analizados em conjunto, estes resultados demonstram o papel modulador de andrógenos/AR e estrógenos/ER sobre a resposta imune-inflamatória (Cunningham, Gilkeson¹⁸, 2011; Lai et al.⁴¹, 2012), além dos efeitos opostos que exercem sobre os tecidos conjuntivo e epitelial durante o processo de cicatrização tecidual (Romana-Souza et al.⁶⁹, 2014).

2.6 Papel de Hormônios Esteroides Sexuais Sobre os Tecidos Periodontais

Assim como nos tecidos da pele, receptores de hormônios esteroides sexuais são expressos por diversas células do periodonto (Mariotti, Mawhinney⁴⁷, 2013), os quais podem contribuir para progressão das doenças periodontais (Mascarenhas et al.⁴⁹, 2003).

Apesar de mulheres grávidas apresentarem maiores índices de gengivite (Tilakaratne et al.⁸⁸, 2000), a deficiência de estrógeno pode ser considerada um fator coadjuvante para a manifestação da doença periodontal (Reynolds et al.⁶⁸, 2004; Haas et al.²⁹, 2009). Em modelos animais de doença periodontal, foi constatada a maior reabsorção óssea alveolar em fêmeas ovariectomizadas (Bezerra et al.⁷, 2013; Blasco-Baque et al.⁹, 2012; Chen et al.¹³, 2015; Dai et al.¹⁹, 2016), além de maior expressão de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 beta (IL-1 β), IL-6 e TNF- α no tecido conjuntivo gengival, visto que a suplementação com estradiol

promoveu a redução da resposta imune-inflamatória nos tecidos gengivais, sugerindo o papel anti-inflamatório deste hormônio esteroide na doença periodontal (Blasco-Baque et al.⁹, 2012).

Similarmente aos efeitos causados pela diminuição dos níveis de estrógeno (Haas et al.²⁹, 2009), foi demonstrado que a privação de andrógenos em homens e animais está associada a maior susceptibilidade à doença periodontal (Famili et al.²², 2007; Wang et al.⁹⁴, 2016), e que o uso prolongado de hormônios androgênicos foi responsável pelo espessamento gengival em atletas levantadores de peso (Ozcelik et al.⁶², 2006). Além disso, em modelos de doença periodontal induzida por ligaduras, observou-se maior perda óssea alveolar e diminuição dos níveis de fósforo e fosfatase alcalina promovidos por doses elevadas de testosterona (Steffens et al.⁷⁹, 2014), aumento da expressão de IL-1 β nos tecidos gengivais devido à orquiectomia, maior perda óssea alveolar ocasionada tanto pela inibição farmacológica de receptores de andrógenos quanto por orquiectomia (Steffens et al.⁷⁷, 2015), além do aumento da área gengival associado a níveis subfisiológicos e suprafisiológicos de testosterona (Steffens et al.⁷⁸, 2012).

Diante destes resultados, é possível afirmar que assim como nos tecidos da pele, hormônios esteroides sexuais desempenham papel modulador nos tecidos periodontais, e podem influenciar a progressão das doenças periodontais (Güncü et al.²⁸, 2005). Todavia, os mecanismos de ação e interação entre hormônios esteroides sexuais e as células residentes dos tecidos periodontais ainda não foram completamente elucidados (Mariotti, Mawhinney⁴⁷, 2013).

2.7 Efeitos de Hormônios Esteroides Sexuais Sobre Fibroblastos e Células Epiteliais

Os efeitos de hormônios esteroides sexuais e seus precursores foram avaliados sobre fibroblastos dérmicos em cultura celular, onde foi observado que o tratamento com 17 β -estradiol e dehidroepiandrosterona (DHEA) suscitou o aumento da migração celular, sendo o efeito da DHEA inibido pela administração de anastrozol que, isoladamente, não influenciou a migração de fibroblastos em cultura celular (Stevenson et al.⁸⁰, 2009). Similarmente, foi demonstrado que a diminuição da viabilidade celular após os tratamentos com doses crescentes de DHEA, DHEA-sulfato, testosterona, anastrozol e 17 β -estradiol não exerceram influência sobre a migração de fibroblastos e células epiteliais em cultura celular. Ademais, a

testosterona (50nM) e o 17 β -estradiol (1nM) foram responsáveis por acelerar a migração de ambos tipos celulares, sendo o efeito parcial da testosterona completamente revertido pelo anastrozol (100nM) que, por si só, não interviu na migração de fibroblastos ou células epiteliais in vitro (Pomari et al.⁶⁷, 2015).

O efeito modulador da testosterona foi verificado sobre eventos celulares e moleculares de fibroblastos de origem cardíaca em cultura celular, onde o tratamento com 10nM de testosterona foi responsável por inibir a migração, proliferação, e diferenciação de miofibroblastos, induzidas por fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1), além da síntese de colágeno induzida por TGF- β 1 e angiotensina II, sendo estes efeitos inibitórios suprimidos após a administração de 5 μ M de nilutamida, antagonista do receptor de andrógeno (Chung et al.¹⁵, 2014). Todavia, estes autores demonstraram os efeitos inexpressíveis do uso isolado de testosterona sobre eventos celulares e moleculares de fibroblastos, em conformidade com resultados anteriores que demonstraram os efeitos exíguos de concentrações de DHT 10nM e 100nM sobre a migração e proliferação de fibroblastos da derme (Gilliver et al.²⁴, 2009).

Em contrapartida, foi observada maior proliferação de fibroblastos gengivais humanos em cultura celular após a administração de DHT, devido, em parte, ao aumento da expressão de ácido graxo sintase (FAS) e do receptor de andrógeno (Coletta et al.¹⁷, 2002; Almeida et al.², 2005). Além disso, tanto a testosterona quanto o DHT, foram responsáveis por promover a migração de fibroblastos embrionários (linhagem NIH3T3) (Castoria et al.¹², 2011), diminuição da expressão gênica de IL-6 por fibroblastos gengivais humanos in vitro (Parkar et al.⁶⁵, 1998; Gornstein et al.²⁶, 1999; Coletta et al.¹⁷, 2002), além da diminuição de TGF- β 1 e TNF- α por fibroblastos da derme de ratos (Gilliver et al.²³, 2006).

O papel da enzima 5 α -redutase foi observado por meio da capacidade de fibroblastos gengivais humano metabolizarem hormônios esteroides androgênicos, na presença de produtos bacterianos derivados de *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *A. actinomycetemcomitans* (Soory, Ahmad⁷⁵, 1997), na presença ou ausência de minociclina (Soory, Virdi⁷⁶, 1998), e durante o tratamento com diferentes concentrações de E₂ e progesterona (Tilakaratne, Soory⁸⁷, 1999).

A ação biológica de andrógenos sobre células epiteliais foi relatada por (Pan et al.⁶³, 1999), que demonstraram os efeitos inibitórios da testosterona 1nM sobre a proliferação de queratinócitos da epiderme. Além do mais, (Gilliver et al.²⁴, 2009) demonstraram a inibição

da atividade migratória de queratinócitos da epiderme, após o tratamento com 100nM de DHT. De modo semelhante, os tratamentos com concentrações crescentes de T (10nM à 10µM) foram responsáveis por causar a inibição da migração de células epiteliais (linhagem HaCaT) em cultura celular, sendo este efeito revertido pela administração de 1µM de flutamida (Toraldó et al.⁸⁹, 2012). Além disso, estes autores demonstraram que a administração de T (100nM) não influenciou a proliferação das células epiteliais in vitro.

2.8 Colágeno e Ácido Hialurônico

O colágeno representa uma das proteínas mais abundantes nos seres vivos e um dos principais componentes da matriz extracelular no tecido conjuntivo (Tan et al.⁸⁴, 1995; Shoulders, Raines⁷², 2009). Secretado por uma variedade de tipos celulares (Tajima, Pinnell⁸¹, 1981; Takuwa et al.⁸³, 1991), o colágeno é composto por três cadeias polipeptídicas, sendo as mais comuns prolina-hidroxiprolina-glicina, as quais encontram-se entrelaçadas em forma de trípla-hélice, também conhecida como tropocolágeno, compondo de forma complexa a rede de fibras e fibrilas colágenas observadas no tecido ósseo e membranas basais (Shoulders, Raines⁷², 2009). Dentre a superfamília dos colágenos, os tipos I, II e III representam as formas mais comuns de colágenos intersticiais (Olsen⁶⁰, 1995), sendo o colágeno tipo I o mais abundante no tecido periodontal (Nanci, Bosshardt⁵⁷, 2006). A síntese de colágeno do tipo I por fibroblastos gengivais humano em cultura pode ser regulada por moléculas proteicas como TGF-β1, IL-6 e interferon-γ (IFN-γ) (Martelli-Junior et al.⁴⁸, 2003), pelo lipopolissacarídeo bacteriano (Takahashi et al.⁸², 2008), além de ser mediada pelo receptor de andrógeno (Lin et al.⁴⁵, 2012).

O polissacarídeo hialuronan representa um dos principais componentes da matriz extracelular, sendo sintetizado por três isoenzimas hialuronan sintase (Has1-3) (Mueller et al.⁵⁴, 2013), as quais são expressas por fibroblastos gengivais humano em cultura celular (Hashikawa et al.³², 2006). Em cultura primária de fibroblastos isolados de camundongos, foi demonstrada a capacidade da IL-6 e o seu receptor solúvel (sIL-6R) estimularem a expressão gênica, principalmente de Has1 e 2, e em menor grau, a expressão de Has3, sugerindo o papel regulador desta interleucina e seu receptor solúvel no processo de síntese do ácido hialurônico (Mueller et al.⁵⁴, 2013).

Apesar de células HaCaT representarem a linhagem de células epiteliais epidérmicas aneuploides (Boukamp et al.¹¹, 1988), de acordo com a literatura, fibroblastos e queratinócitos fornecem respostas adequadas quando se pretende avaliar a influência de andrógenos sobre o comportamento destas células em cultura (Welder et al.⁹⁵, 1995; Tilakaratne, Soory⁸⁷, 1999; Coletta et al.¹⁷, 2002; Gingras et al.²⁵, 2003; Almeida et al.², 2005; Gilliver et al.²⁴, 2009; Toraldo et al.⁸⁹, 2012).

3 PROPOSIÇÃO

A hipótese geral deste estudo é de que hormônios esteroides androgênicos possuem papel regulador sobre eventos celulares e moleculares de fibroblastos e células epiteliais in vitro. Para testar esta hipótese, este estudo tem como propostas:

- a) Avaliar a influência de concentrações crescentes de testosterona e DHT sobre a proliferação e atividade de fibroblastos e células epiteliais em cultura celular;
- b) Avaliar os efeitos do inibidor farmacológico da enzima aromatase, e de sua associação à testosterona, sobre a proliferação e atividade de fibroblastos e células epiteliais em cultura celular;
- c) Avaliar os efeitos de inibidores farmacológicos de receptores de andrógeno ou estrógeno, e suas respectivas associações à testosterona, sobre a proliferação e atividade de fibroblastos e células epiteliais em cultura celular.

4 MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados fibroblastos gengivais entre a 5ª e 10ª passagem (fibroblastos gengivais - hGF - cultura primária), e células epiteliais (linhagem HaCaT, de células epiteliais humanas - linhagem imortalizada - Cell Line Service - 300493).

Amostras de aproximadamente 1.0 mm³ do tecido gengival, na região de papila interdental, foram obtidas de três pacientes jovens (18-25 anos), do gênero feminino, durante procedimento de extração dentária. Como critérios de exclusão, os pacientes não deveriam ser tabagistas ou estar fazendo uso de medicamentos, não possuir doenças sistêmicas, e não apresentar doença periodontal, sendo que estes dados foram coletados por meio de anamnese e exame clínico. Todos os procedimentos realizados neste estudo seguiram as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr/UNESP, após a aprovação do protocolo de pesquisa CAAE 48882715.4.0000.5416 (Anexo A) e com prévio consentimento dos pacientes, por meio de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

A porção de gengiva obtida de cada paciente foi colocada em tubo Falcon de 15 mL (TPP - Techno Plastic Products AG, Zollstrasse, Trasadingen, Suíça) contendo meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco®, Life Technologies™, Grand Island, NY, EUA) com fenol red, 10% de soro fetal bovino - SFB (Gibco®, Life Technologies™), além de antibióticos e antimicóticos (10.000 unidades/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de fungizone® - Gibco®, Life Technologies™).

Através de dissociação enzimática, os fibroblastos gengivais foram isolados utilizando-se collagenase tipo I (Worthington Biochemical Corp, Lakewood, NJ, EUA). Para isso, as amostras de tecido gengival foram colocadas em placas de cultura de 6 poços (TPP), contendo 3 mL de DMEM e 3 mg/mL de solução enzimática. Após 24 horas (h) de incubação a 37°C em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂ e 95% de ar (Thermo Scientific™ REVCO™, Waltham, Massachusetts, EUA), o meio de cultura contendo o fragmento de tecido e fibroblastos isolados, foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL (TPP), sendo centrifugados a 1.600 rpm (4.000 x g, Centrífuga Baby FANEM®, São Paulo, Brasil) por 2 minutos (min). Em seguida, o pellet formado foi ressuspensionado em 1.0 mL de DMEM suplementado (10% de SFB), e transferido para um frasco de cultura celular de 75 cm² (TPP).

4.1 Cultura de Células

Fibroblastos e células epiteliais foram cultivados em frascos com área de crescimento de 75 cm² (TPP) a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar (Thermo Scientific™ REVCO™) em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB (Gibco®, Life Technologies™), 2.0 mM de L-glutamina, aminoácidos não-essenciais e 1% de antibióticos (10.000 U/mL de penicilina e 10.000 µg/mL de estreptomicina). As substituições do meio de cultura foram realizadas a cada 48h, e o crescimento celular avaliado a cada 24h. Após atingirem confluência necessária de 80%, as células foram lavadas com 10.0 mL de solução salina tamponada – PBS (Sigma-Aldrich®, Co., St. Louis, MO, EUA) e, após a remoção desta solução tampão, foram mantidas por 10 min em incubadora a 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar, com 5.0 mL de tripsina a 0.25% para o total desprendimento celular. Posteriormente, adicionou-se 10.0 mL de meio de cultura suplementado para inativar a ação da tripsina e, então, o conteúdo celular transferido para um tubo Falcon de 15,0 mL (TPP) foi centrifugado por 2 min a 1.600 rpm. Após o fracionamento celular e descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 5.0 mL de meio de cultura suplementado e em seguida, após homogeneização, adicionou-se 20µL da suspensão celular à 20µL de Azul Tripán 0.4% (Gibco®, Life Technologies™) para a contagem de células viáveis em hemocitômetro. Após a contagem, estas células foram cultivadas em placas de 24 poços para a realização dos experimentos.

4.2 Grupos Experimentais

Consistiram os grupos experimentais: testosterona - T (Durateston®; Schering-plough), di-hidrotestosterona - DHT (Sigma-Aldrich®), anastrozol - ANA (Sigma-Aldrich®), flutamida - FLU (Sigma-Aldrich®), fulvestranto - FUL (ICI 182,780; Sigma-Aldrich®) e as associações farmacológicas: testosterona e anastrozol (T+ANA); testosterona e flutamida (T+FLU); e testosterona e fulvestranto (T+FUL). De modo a obter a concentração inicial das soluções de estoque, todos os fármacos foram previamente preparados em etanol absoluto, conforme as especificações do fabricante (Sigma-Aldrich®). A concentração de etanol (EtOH) ≤ a 0.1% foi utilizada como grupo controle, e as concentrações finais dos fármacos foram obtidas pela diluição das soluções de estoque em DMEM (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação dos grupos controle e experimentais utilizados em fibroblastos gengivais e células epiteliais de acordo com as suas respectivas doses. hGF - fibroblastos gengivais humano; HaCaT - linhagem de células epiteliais; EtOH - etanol.

Grupos	[] farmacológica	hGF	HaCaT
Controle (EtOH)	$\leq 0.1\%$	+	+
T	1nM	+	+
T	10nM	+	+
T	100nM	+	+
T	1 μ M	+	-
DHT	1nM	+	+
DHT	10nM	+	+
DHT	100nM	+	+
DHT	1 μ M	+	-
ANA	10nM	+	+
FLU	10nM	+	+
FUL	10nM	+	+
T+ANA	1nM + 10nM	+	+
T+FLU	1nM + 10nM	+	+
T+FUL	1nM + 10 nM	+	+

Autor: Luís Carlos Leal Santana.
Fonte: Autoria própria.

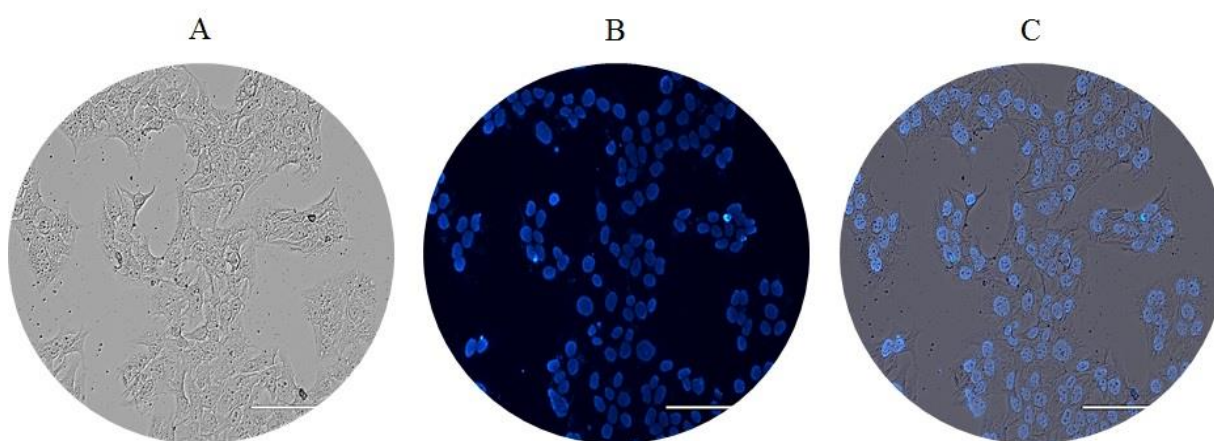
4.3 Ensaio de Proliferação Celular

A proliferação celular foi determinada a partir do método fluorimétrico Hoechst Stain Solution 33258 (Sigma-Aldrich®), utilizado em estudos anteriores para a quantificação do número de células em cultura (Papadimitriou, Lelkes⁶⁴, 1993; Murphy et al.⁵⁶, 2010). Este método baseia-se na ligação seletiva de bis-benzimida, um corante fluorescente, permeável às células, às bases nitrogenadas adenina-timina no DNA, possibilitando a identificação e contagem de células marcadas com o corante (Papadimitriou, Lelkes⁶⁴, 1993; Zhang, Kiechle¹⁰⁰, 1998).

Assim, foram semeadas em meio de cultura suplementado, 3.0×10^4 células por poço, em triplicata, sendo incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar (Thermo Scientific™ REVCO™), por um período de 24h. Em seguida, para que todas as células atingissem a mesma fase do ciclo celular (G₀), o meio de cultura foi trocado por DMEM sem SFB, permanecendo por 24h (Iyer et al.³⁵, 1999). Após este período, o meio de

cultura não suplementado foi removido, as células foram lavadas duas vezes com 500 μ L de PBS (Sigma-Aldrich[®]), e os fármacos administrados por 24h. Seguido o período de tratamento farmacológico, o sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas por 1h com 250 μ L de paraformaldeído 4%, em geladeira. Posteriormente, as placas foram retiradas da geladeira, e a solução de paraformaldeído 4% foi descartada em recipiente especial. Após a lavagem dos poços com PBS (Sigma-Aldrich[®]), e secagem em temperatura ambiente, o núcleo celular foi marcado com a solução Hoechst Stain Solution 33258 (Sigma-Aldrich[®]) por 15 min. Para a marcação celular, a solução Hoechst 33258 foi previamente diluída 10 $\times$ (1:9) e então, foram adicionados 300 μ L a cada poço da placa de 24 poços, protegendo-a de luz. Após 15 min, as placas foram fotografadas e analisadas usando-se um microscópio digital invertido de transmissão e fluorescência (AMG, Evos fl[®]) (Figura 7). Em seguida, todas as imagens foram binarizadas e, dentro de uma região de interesse (ROI), o número estimado de células foi determinado pela contagem automatizada dos núcleos com o auxílio de um software de imagem (ImageJ[®]; NIH, EUA), utilizando o *plug-in Image-based Tool for Counting Nuclei* (ITCN).

Figura 7 - Representação esquemática ilustrando a identificação de células epiteliais cultivadas em placas de 24 poços. Os pontos azuis referentes às imagens **B** e **C** ilustram o núcleo celular marcado com Hoechst Stain Solution 33258. Imagens: **A**. fotomicrografia de transmissão, **B**. fotomicrografia de fluorescência, e **C**. sobreposição de imagens (aumento focal de 40x).



Autor: Luís Carlos Leal Santana.
Fonte: Autoria própria.

4.4 Ensaio de Atividade Metabólica

O metabolismo celular foi determinado pelo método colorimétrico Alamar Blue[®] (Invitrogen[®], Life Technologies). Este método determina a atividade mitocondrial celular, podendo assim esta atividade ser considerada a taxa metabólica das células vivas. Diferente do ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), o Alamar Blue[®] é um método mais sensível (Hamid et al.³⁰, 2004) e não necessita da lise celular para obter dados relativos à atividade metabólica. A redução de resazurin, um corante azul e não fluorescente, em resorufin, um corante rosa e fluorescente, é avaliada por meio de absorbância ou fluorimetria (O'brien et al.⁵⁹, 2000).

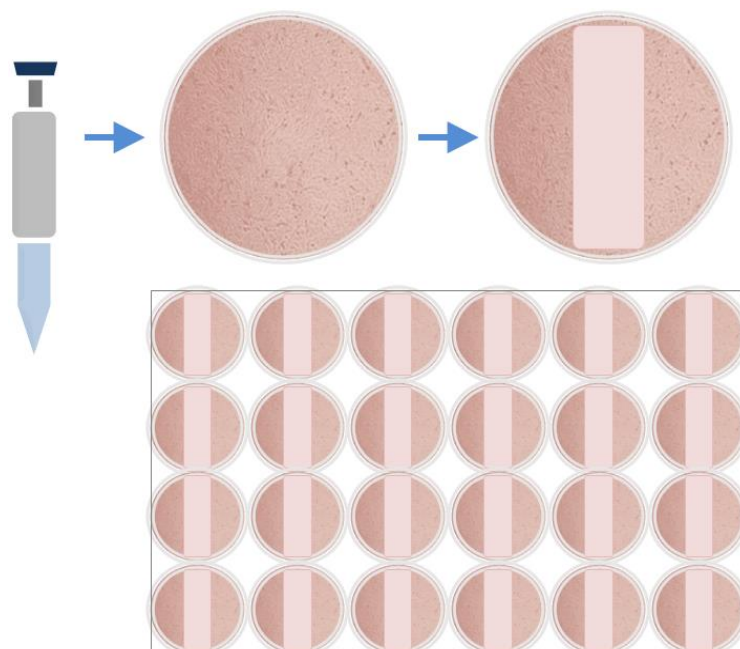
Após a administração farmacológica pelo período proposto para se avaliar a proliferação de fibroblastos e células epiteliais, o sobrenadante celular foi removido e substituído por 900µL de DMEM sem SFB associado a 100µL da solução de Alamar Blue[®]. As células em contato com Alamar Blue[®] a 0,1% foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂ e 95% de ar (Thermo Scientific[™] REVCO[™]), por 4h. Após este período, 100µL do Alamar Blue[®] a 0.1% foi transferido para placas de 96 poços e as amostras foram analisadas por um espectrofotômetro (Synergy H1, BioTek[™], Winooski, VT, EUA) nos comprimentos de onda 570/600 nm.

4.5 Ensaio de Arranhão In Vitro - “*Scratch Assay*”

O ensaio “*scratch*” é um método clássico utilizado para se determinar a migração de células em cultura. Esta técnica consiste na confecção de um arranhão em uma monocamada de células aderentes, utilizando-se a extremidade mais afilada de uma ponteira, as quais são avaliadas por períodos regulares, observando-se a diminuição da área de arranhão, sendo esta diminuição correspondente à taxa de atividade migratória das células em cultura (Liang et al.⁴³, 2007). Para verificar o efeito farmacológico de andrógenos, de antiandrógenos e antiestrógenos, e do inibidor da enzima aromatase sobre a capacidade migratória de fibroblastos e células epiteliais, este ensaio foi realizado com base em protocolos para cicatrização de feridas in vitro (Hoang et al.³³, 2000; Lackler et al.³⁹, 2000; Mumford et al.⁵⁵, 2001; Basso et al.⁶, 2012; Toraldo et al.⁸⁹, 2012).

Assim, foram cultivadas em meio de cultura suplementado, 8.0×10^4 células por poço, em triplicata, sendo incubadas a 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar (Thermo Scientific™ REVCO™) até que atingissem confluência necessária. Em seguida, o meio de cultura suplementado foi trocado por DMEM sem SFB, e mantido por 24h para que todas as células atingissem o mesmo estágio do ciclo celular (G₀) (Iyer et al.³⁵, 1999). Após quiescência celular, um “arranhão” in vitro foi realizado na monocamada de células, em cada poço, usando-se a extremidade mais afilada de uma ponteira (ponteira de 1.0 mL - células HaCaT; e 5.0 mL - hGF) (Figura 8). Seguida a confecção do “scratch”, o meio de cultura foi aspirado, as células foram lavadas duas vezes com 500 µL de PBS (Sigma-Aldrich®), e os fármacos foram administrados por 24h (células HaCaT) e 72h (fibroblastos). Decorrido o período de tratamento, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C, e as células foram fixadas por 1h com 250 µL de paraformolaldeído 4%, em geladeira. Posteriormente, as placas foram retiradas da geladeira e a solução de paraformolaldeído 4% foi descartada em recipiente especial. Os poços foram lavados com 500 µL de PBS (Sigma-Aldrich®), e após secagem em temperatura ambiente, as células foram coradas com Cristal Violeta 0.1% por 15 min. Seguido este tempo, as células foram lavadas com água destilada, e após secagem, fotografias foram realizadas em cada poço por meio de uma câmera fotográfica (Leica DFC295, Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha) acoplada a um estereomicroscópio (Leica MZ6, Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha), com aumento focal de 2.5×. A área de “arranhão” referente a cada imagem foi determinada com o auxílio de um software de imagem usando-se o plug-in *MRI Wound Healing Tool* (ImageJ®; NIH, EUA). Cada imagem foi analisada por um mesmo examinador, e desta forma, a área de “scratch” pode ser mensurada.

Figura 8 - Esquema representativo ilustrando o ensaio de “scratch”, onde foi utilizada a extremidade mais afilada de uma ponteira para a confecção de um “arranhão” *in vitro* em fibroblastos gengivais e em células epiteliais cultivados em placas de 24 poços.



Autor: Luís Carlos Leal Santana.

Fonte: Autoria própria.

4.6 Análise da Síntese de Ácido Hialurônico

A avaliação da síntese de ácido hialurônico por fibroblastos (Hyaluronan; R&D systems) foi mensurada a partir do sobrenadante celular, por meio de Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA), sendo este ensaio realizado de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante, em quadruplicata. Todas as amostras foram analisadas em um espectrofotômetro (Synergy H1, BioTek™) no comprimento de onda 450nm/540nm. Os valores numéricos referentes à concentração proteica expressa em cada grupo foram submetidos à análise estatística para posterior interpretação dos resultados.

4.7 Análise dos Resultados

Os dados referentes ao impacto de andrógenos sobre a proliferação e atividade de fibroblastos e células epiteliais foram submetidos à análise estatística através dos testes Kolmogorov-Smirnov, Análise de Variância Um-Critério (One-Way ANOVA) e teste post-

hoc de Tukey, com auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADO

Este estudo verificou a influência de andrógenos sobre o comportamento de fibroblastos gengivais e células epiteliais em cultura celular. Para facilitar a visualização e interpretação, os resultados serão apresentados separadamente de acordo com os tipos celulares estudados.

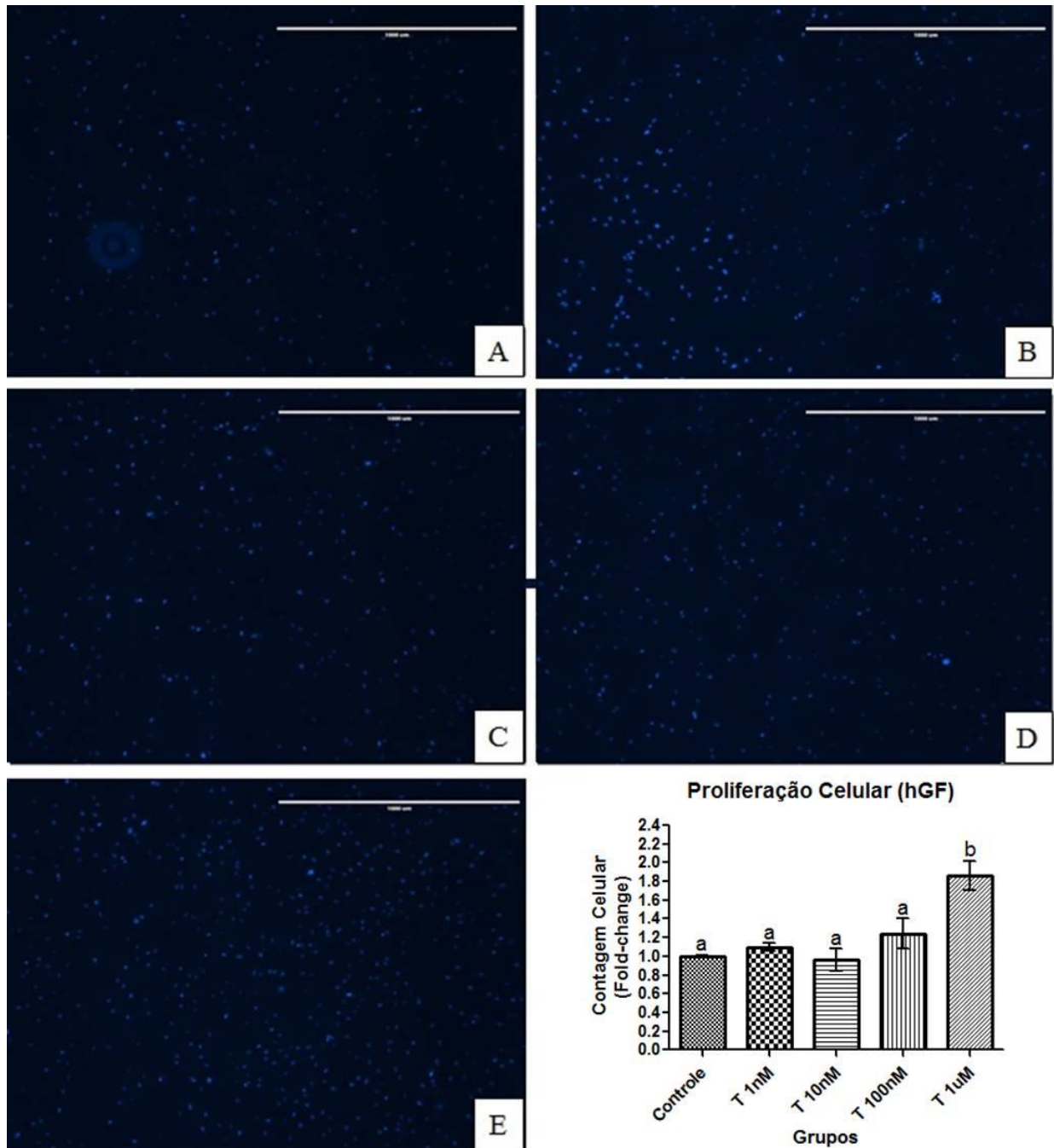
5.1 Fibroblastos Gengivais (hGF)

Nesta seção, serão apresentados os resultados referentes aos ensaios de proliferação, atividade metabólica, migração celular e síntese de ácido hialurônico por fibroblastos de origem humana.

5.1.2 Avaliação da proliferação celular

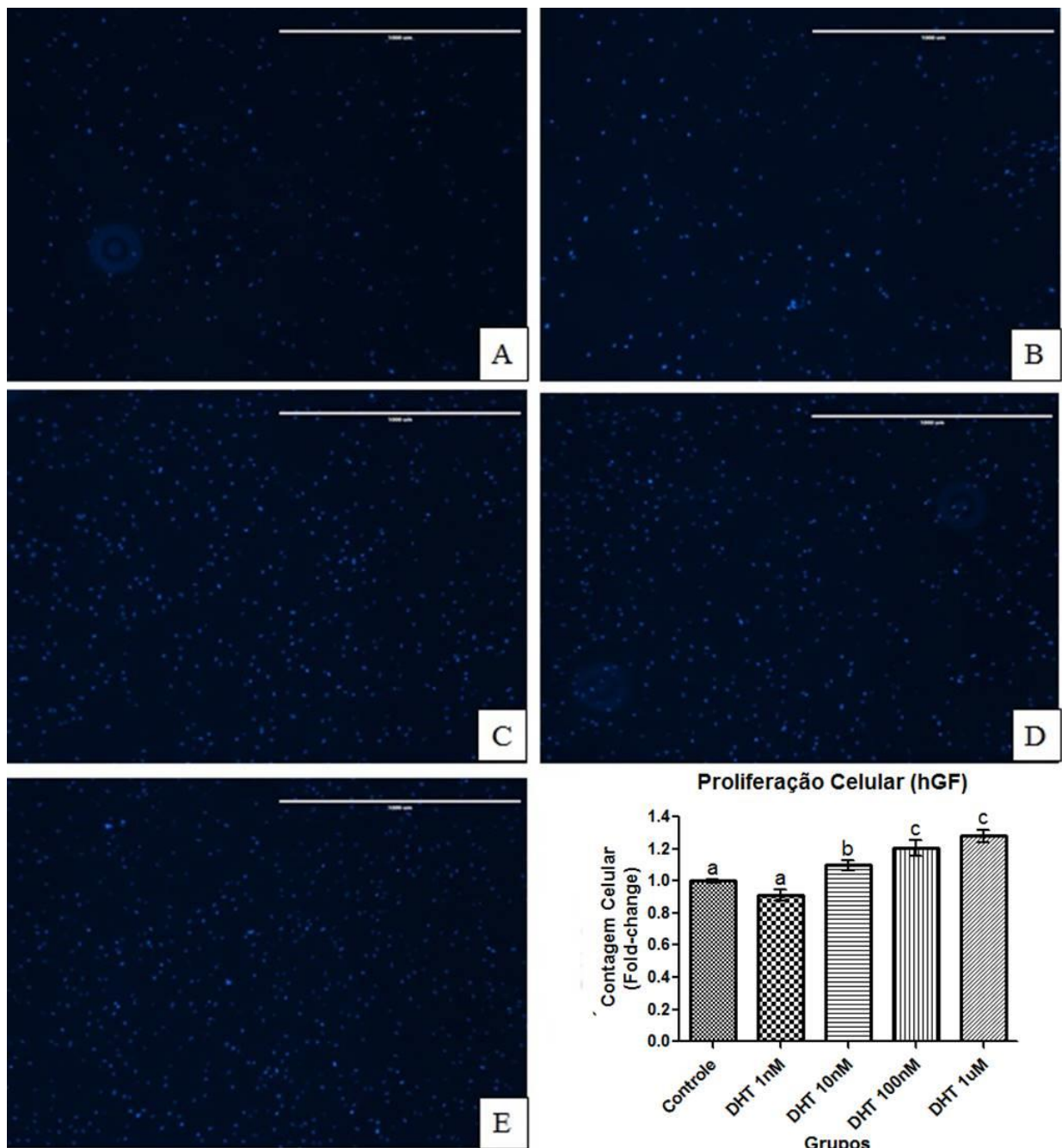
Observou-se que os tratamentos com andrógenos exerceram influência sobre o número estimado de fibroblastos gengivais em cultura celular. Entre as concentrações de T, o tratamento com T 1 μ M induziu o aumento de 86% do número de fibroblastos, em comparação ao grupo controle, e também em relação às demais concentrações de T 1nM (77%), 10nM (90%) e 100nM (62%) (Figura 9). Quanto ao DHT, constatou-se que concentrações crescentes de 10nM, 100nM e 1 μ M, foram responsáveis por aumentar, respectivamente, em 9%, 20% e 28% a contagem do número de fibroblastos gengivais em comparação ao controle. Além disso, respostas distintas foram observadas entre as diferentes concentrações de DHT, havendo similaridade entre os grupos DHT 100nM e 1 μ M (Figura 10).

Figura 9 - Fotomicrografia óptica de fluorescência (DAPI) ilustrando o núcleo de fibroblastos gengivais marcados com Hoechst 33258 (em azul) 24h após o tratamento farmacológico com testosterona (T). A imagem **A** representa o grupo controle (EtOH 0.1%), enquanto que as imagens **B**, **C**, **D** e **E** representam as concentrações de T 1nM, 10nM, 100nM e 1μM, respectivamente. O gráfico mostra a diferença estatística entre os grupos controle e T 1μM, além da diferença estatística entre T 1μM e T 1nM, 10nM e 100nM ($p < 0,001$). As barras no gráfico indicam o *fold-change* da média e as linhas verticais o desvio-padrão. Letras iguais indicam a similaridade dos resultados.



Autor: Luís Carlos Leal Santana.
Fonte: Autoria própria.

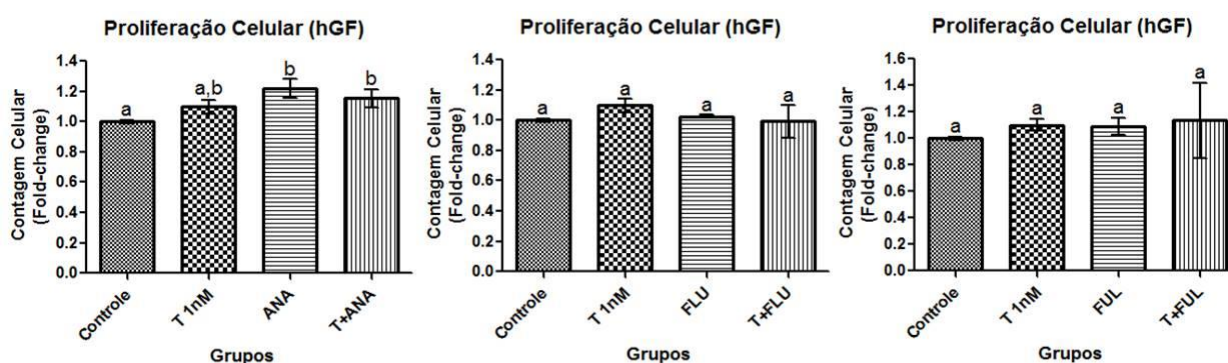
Figura 10 - Fotomicrografia óptica de fluorescência (DAPI) ilustrando o núcleo de fibroblastos gengivais marcados com Hoechst 33258 (em azul) 24h após o tratamento farmacológico com di-hidrotestosterona (DHT). O grupo controle (EtOH 0.1%) está representado pela imagem **A**, enquanto que as imagens **B**, **C**, **D** e **E** representam as concentrações de DHT 1nM, 10nM, 100nM e 1μM, respectivamente. O gráfico mostra a diferença estatística entre os grupos controle e DHT 10nM ($p<0,05$), 100nM e 1μM ($p<0,001$), a diferença estatística entre DHT 1nM e os grupos 10nM, 100nM e 1μM ($p<0,001$), além da diferença estatística entre as concentrações de DHT 10nM e 100nM ($p<0,05$) e 1μM ($p<0,001$). As barras no gráfico indicam o *fold-change* da média e as linhas verticais o desvio-padrão. Letras iguais indicam a similaridade dos resultados.



Autor: Luís Carlos Leal Santana.
Fonte: Autoria própria.

O bloqueio dos receptores de andrógeno e estrógeno por FLU e FUL respectivamente, e suas associações à T, não exerceram influência sobre a contagem de fibroblastos em cultura. Por outro lado, os tratamentos com ANA e T+ANA foram responsáveis por aumentar o número estimado de fibroblastos em 22% e 15%, respectivamente (**Figura 11**).

Figura 11 - O gráfico à esquerda mostra a diferença estatística entre o grupo controle (EtOH 0.1%) e os grupos ANA ($p<0,01$) e T+ANA ($p<0,05$). As barras dos gráficos representam a média e as linhas verticais o desvio-padrão dos fármacos administrados sobre fibroblastos gengivais em cultura. Letras iguais representam a similaridade dos resultados encontrados.



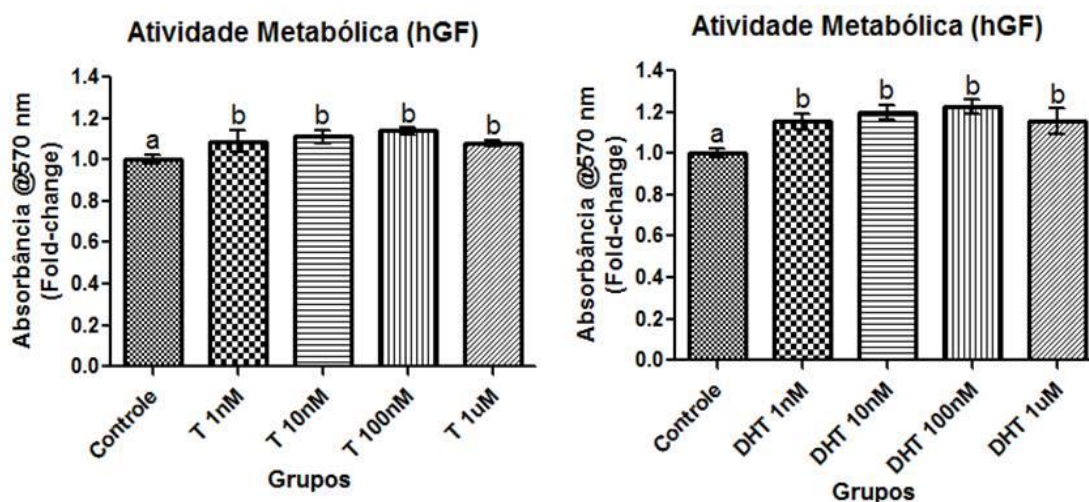
Autor: Luís Carlos Leal Santana.

Fonte: Autoria própria.

5.1.3 Avaliação da atividade metabólica

As diferentes concentrações de T e DHT estimularam o aumento do metabolismo de fibroblastos em cultura, porém, sem diferença estatística entre as concentrações utilizadas ($p>0,05$). Comparado ao controle, a concentração de T 100nM promoveu o aumento de até 13% do metabolismo celular, enquanto que a mesma concentração de DHT promoveu o aumento de 22% (Figura 12). Os grupos ANA, FLU, FUL, e as suas respectivas associações à T, também suscitaram o aumento da atividade metabólica de fibroblastos em cultura. Ainda, este estudou evidenciou o aumento da atividade metabólica no grupo FLU, comparado ao grupo T 1nM (Figura 13).

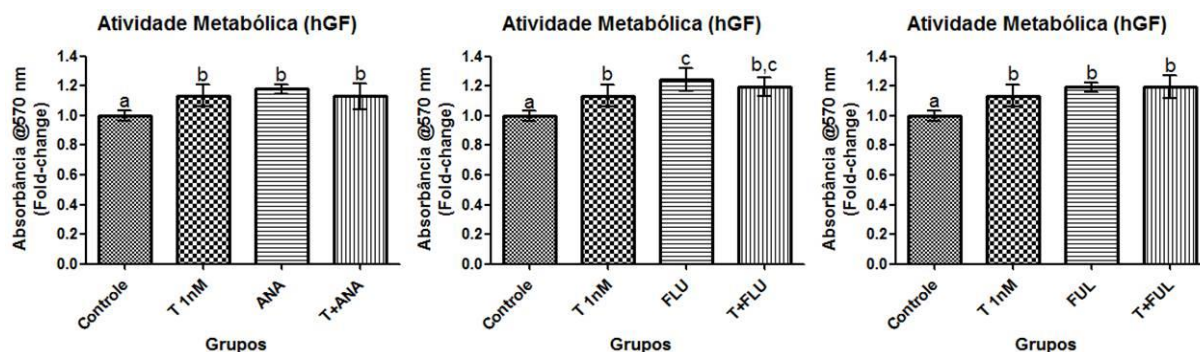
Figura 12 - Os gráficos abaixo ilustram a absorbância do sobrenadante celular 24h após o tratamento farmacológico com T e DHT. À esquerda, gráfico mostra a diferença estatística entre o controle (EtOH 0.1%) e as concentrações crescentes de T 1nM ($p<0,01$), 10nM ($p<0,001$), 100nM ($p<0,001$) e 1 μ M ($p<0,05$). O gráfico à direita mostra a diferença estatística entre o grupo controle (EtOH 0.1%) e as doses de DHT 1nM, 10nM, 100nM e 1 μ M ($p<0,001$). As barras no gráfico indicam o *fold-change* da média e as linhas verticais o desvio-padrão. Letras iguais indicam a similaridade dos resultados.



Autor: Luís Carlos Leal Santana.

Fonte: Autoria própria.

Figura 13 - Os gráficos abaixo ilustram a absorbância do sobrenadante celular 24h após o tratamento farmacológico com anastrozol (ANA), flutamida (FLU) e fulvestranto (FUL), e suas respectivas associações à T. À esquerda, o gráfico mostra a diferença estatística entre o grupo controle (EtOH 0.1%) e os grupos T 1nM ($p<0,01$), ANA ($p<0,001$) e T+ANA ($p<0,01$). À direita, o gráfico mostra a diferença estatística entre o grupo controle (EtOH 0.1%) e os grupos T 1nM ($p<0,01$), FUL e T+FUL ($p<0,001$). E o gráfico centralizado mostra a diferença estatística entre o grupo controle (EtOH 0.1%) e os grupos T 1nM ($p<0,01$), FLU e T+FLU ($p<0,001$), além da diferença encontrada entre os grupos T 1nM e FLU ($p<0,05$). As barras no gráfico indicam o *fold-change* da média e as linhas verticais o desvio-padrão. Letras iguais indicam a similaridade dos resultados.



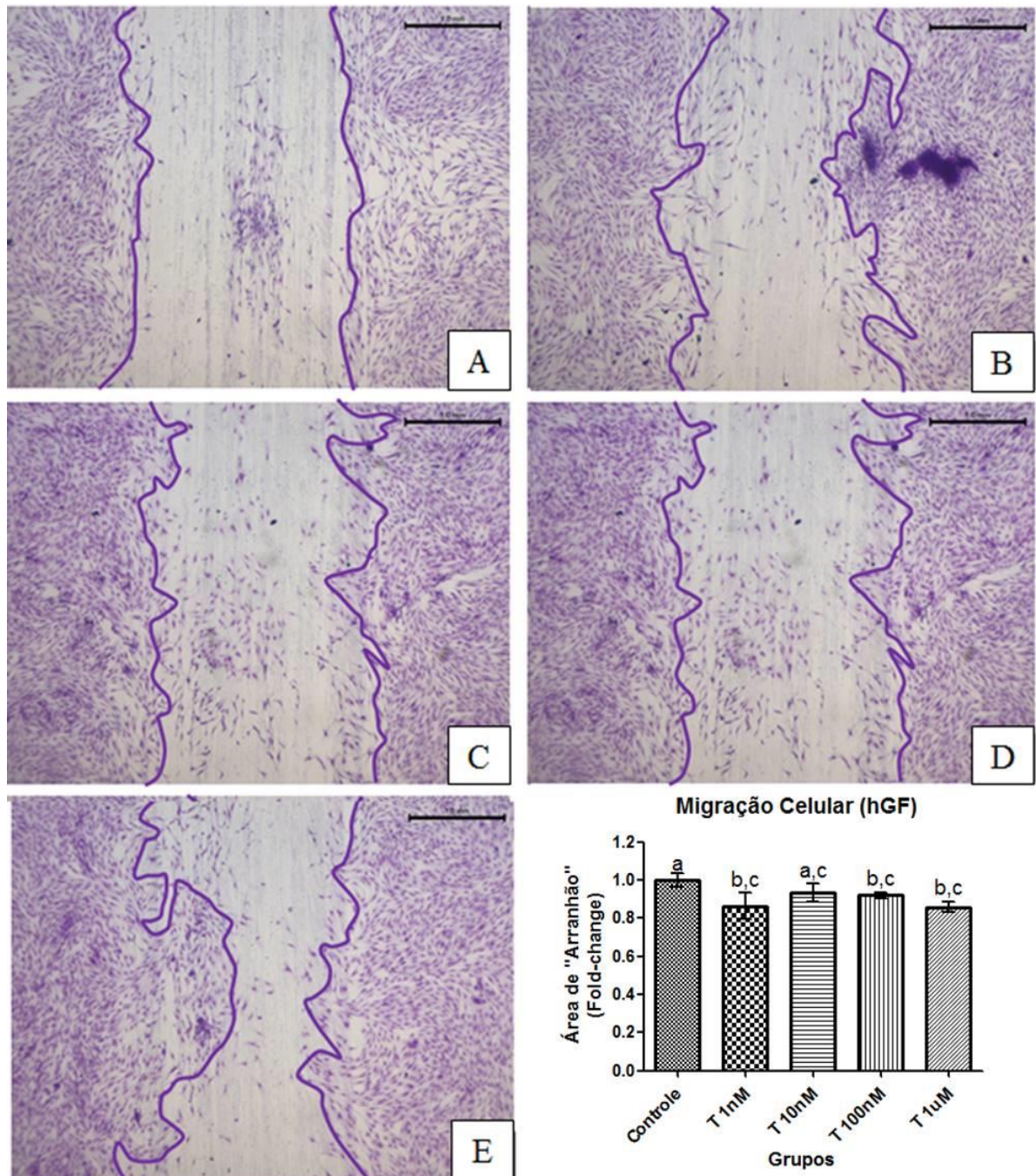
Autor: Luís Carlos Leal Santana.

Fonte: Autoria própria.

5.1.4 Avaliação da migração celular - “*Scratch assay*”

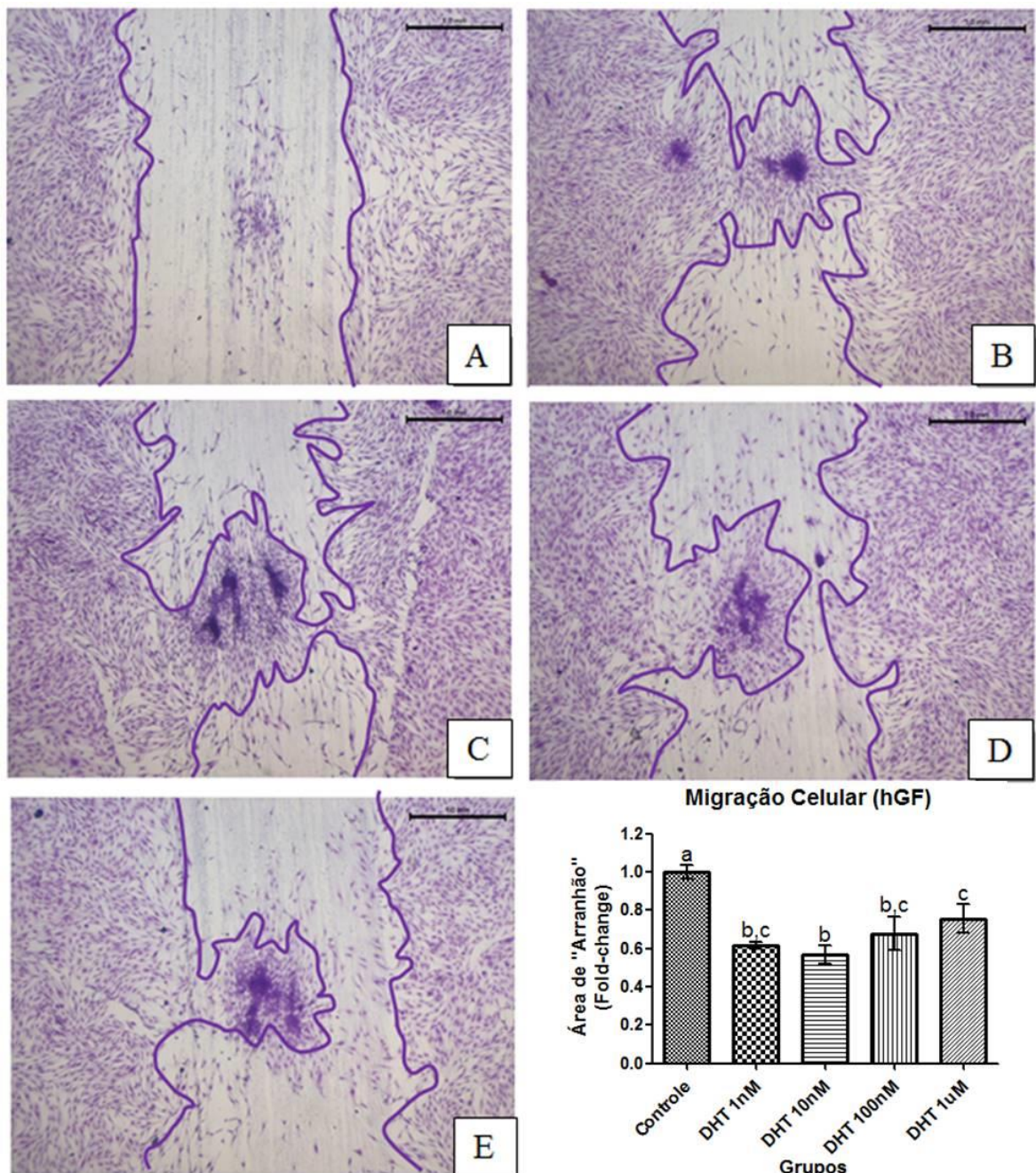
Demonstramos que, após a confecção do arranhão, os tratamentos farmacológicos com hormônios esteroides androgênicos foram responsáveis pelo repovoamento de fibroblastos gengivais *in vitro*. Comparados ao controle, constatou-se a redução da área de arranhão na monocamada celular, após o tratamento com concentrações de T 1nM (14%), 100nM (10%) e 1µM (15%) (Figura 14), enquanto que o DHT promoveu a diminuição na área de arranhão nas concentrações de 1nM (39%), 10nM (44%), 100nM (33%) e 1µM (25%) (Figura 15).

Figura 14 - Estereofotomicroscopia ilustrando o comportamento de fibroblastos gengivais 72h após a realização do arranhão in vitro e tratamento farmacológico com testosterona (T). A imagem **A** representa o controle (EtOH 0.1%), enquanto que as imagens **B**, **C**, **D** e **E** representam, respectivamente, os grupos T 1nM, 10nM, 100nM e 1 μ M (aumento focal de 2.5x). O gráfico mostra a diferença estatística entre o grupo controle e as doses de T 1nM ($p<0,001$), 100nM ($p<0,05$) e 1 μ M ($p<0,001$). As barras no gráfico indicam o *fold-change* da média e as linhas verticais o desvio-padrão. Letras iguais indicam a similaridade dos resultados.



Autor: Luís Carlos Leal Santana.
Fonte: Autoria própria.

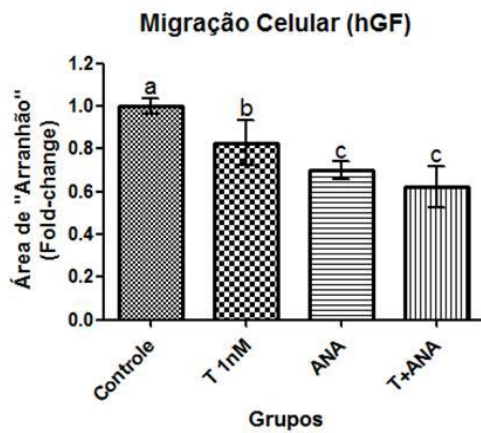
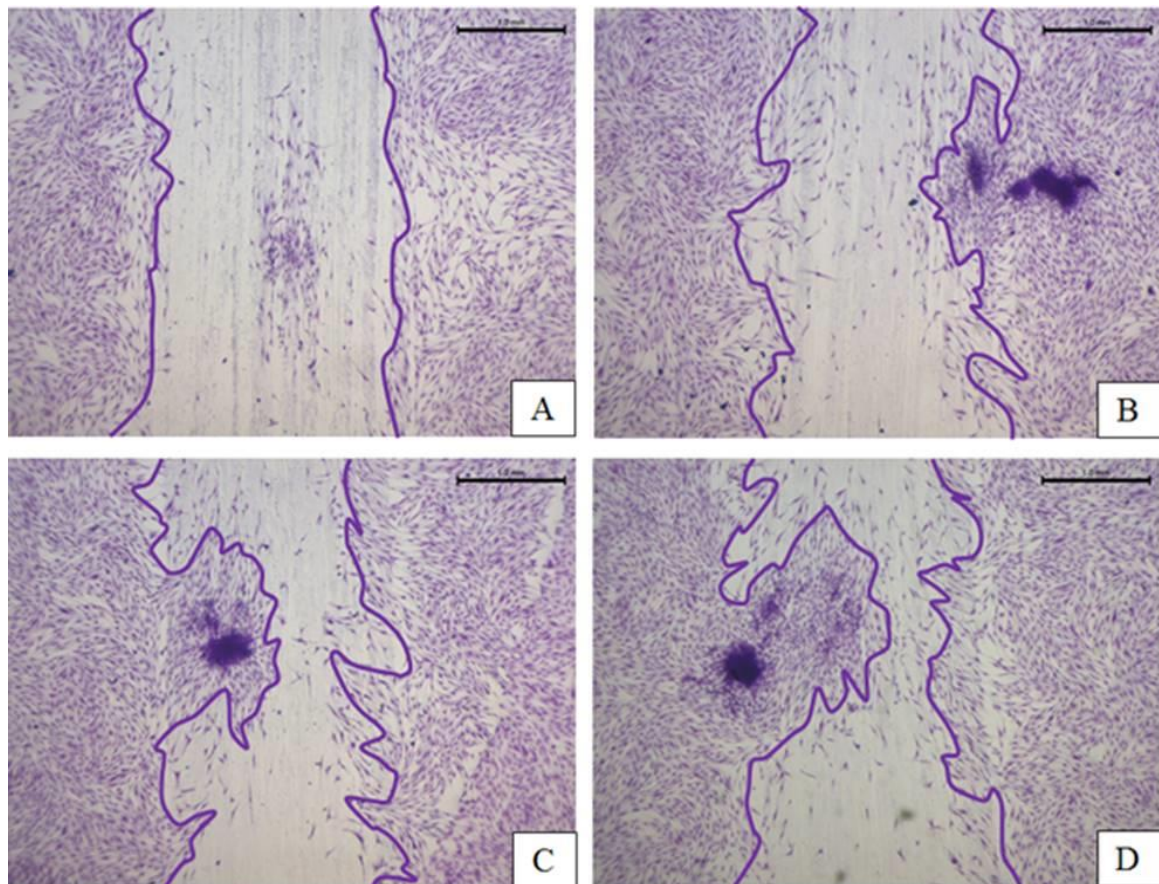
Figura 15 - Estereofotomicroscopia ilustrando o comportamento de fibroblastos gengivais 72h após a realização do arranhão in vitro e tratamento farmacológico com di-hidrotestosterona (DHT). A imagem **A** representa o grupo controle (EtOH 0.1%), enquanto que as imagens **B**, **C**, **D** e **E** representam, respectivamente, os grupos DHT 1nM, 10nM, 100nM e 1µM (aumento focal de 2.5x). O gráfico mostra a diferença estatística entre o grupo controle e as doses de DHT 1nM, 10nM, 100nM e 1µM ($p < 0,001$), além da diferença estatística entre as doses de DHT 10nM e 1µM ($p < 0,01$). As barras no gráfico indicam o *fold-change* da média e as linhas verticais o desvio-padrão. Letras iguais indicam a similaridade dos resultados.



Autor: Luís Carlos Leal Santana.
Fonte: Autoria própria.

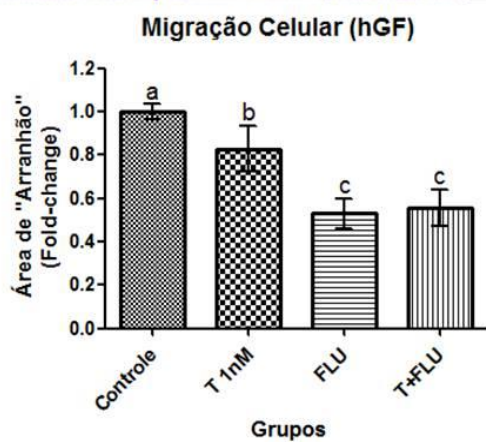
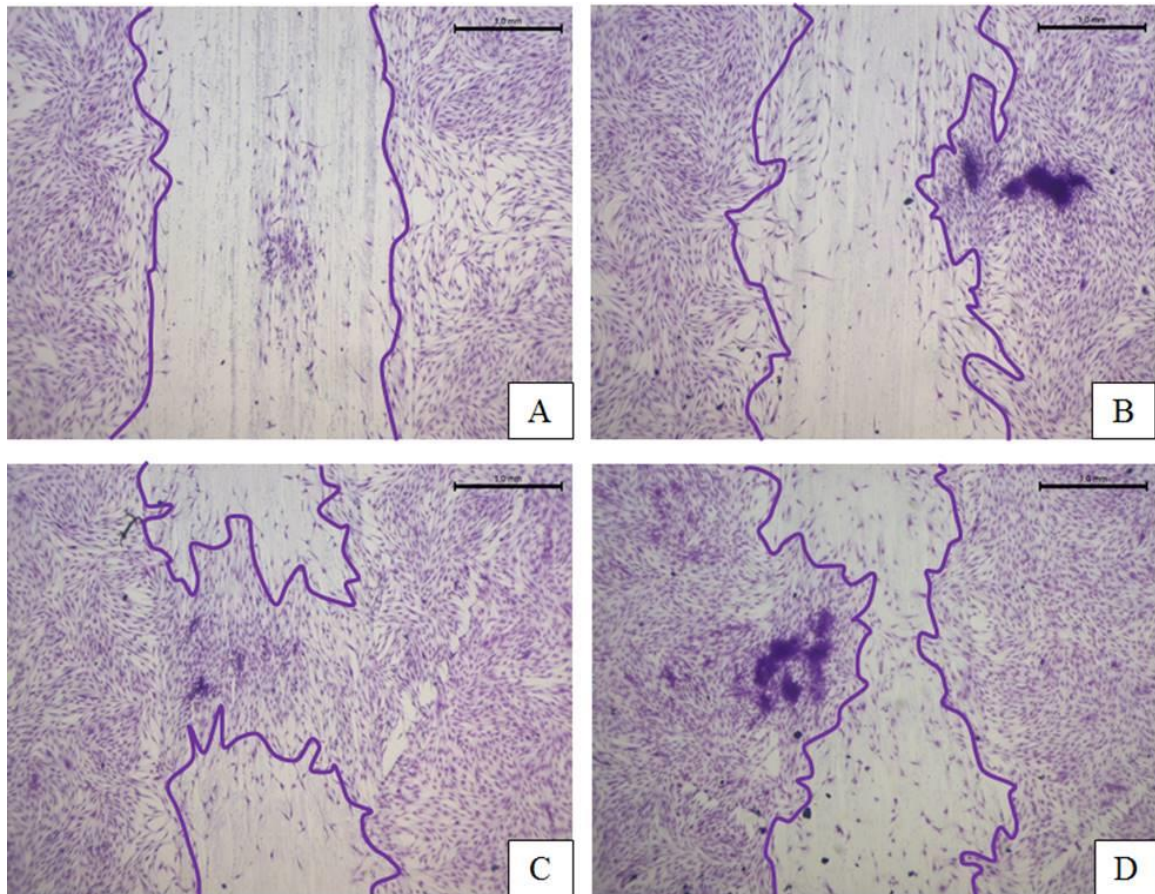
Verificou-se também que, comparado ao controle, a administração farmacológica de ANA e T+ANA ocasionou, respectivamente, a diminuição em 30% e 39% da área de arranhão na monocamada de fibroblastos em cultura (Figura 16), sendo este efeito observado de forma similar nos grupos FLU (48%) e T+FLU (45%) (Figura 17), e FUL (36%) e T+FUL (53%) (Figura 18).

Figura 16 - Estereofotomicroscopia ilustrando o comportamento de fibroblastos gengivais 72h após a realização do arranhão in vitro, representados pela imagem **A** (controle; EtOH 0.1%), **B** (T 1nM), **C** (ANA) e **D** (T+ANA) (aumento focal de 2.5x). O gráfico mostra a diferença estatística entre o controle e os grupos ANA e T+ANA ($p<0,001$), e entre o grupo T 1nM e os grupos ANA ($p<0,05$) e T+ANA ($p<0,001$). As barras no gráfico indicam o *fold-change* da média e as linhas verticais o desvio-padrão. Letras iguais indicam a similaridade dos resultados.



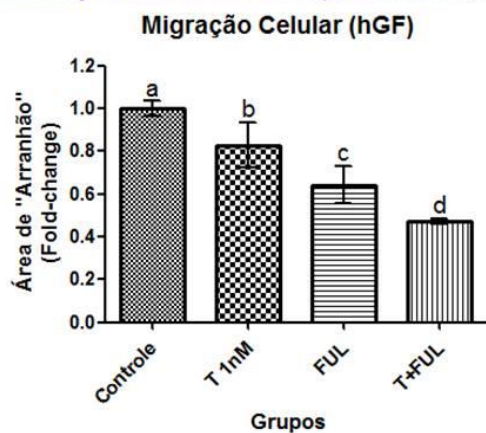
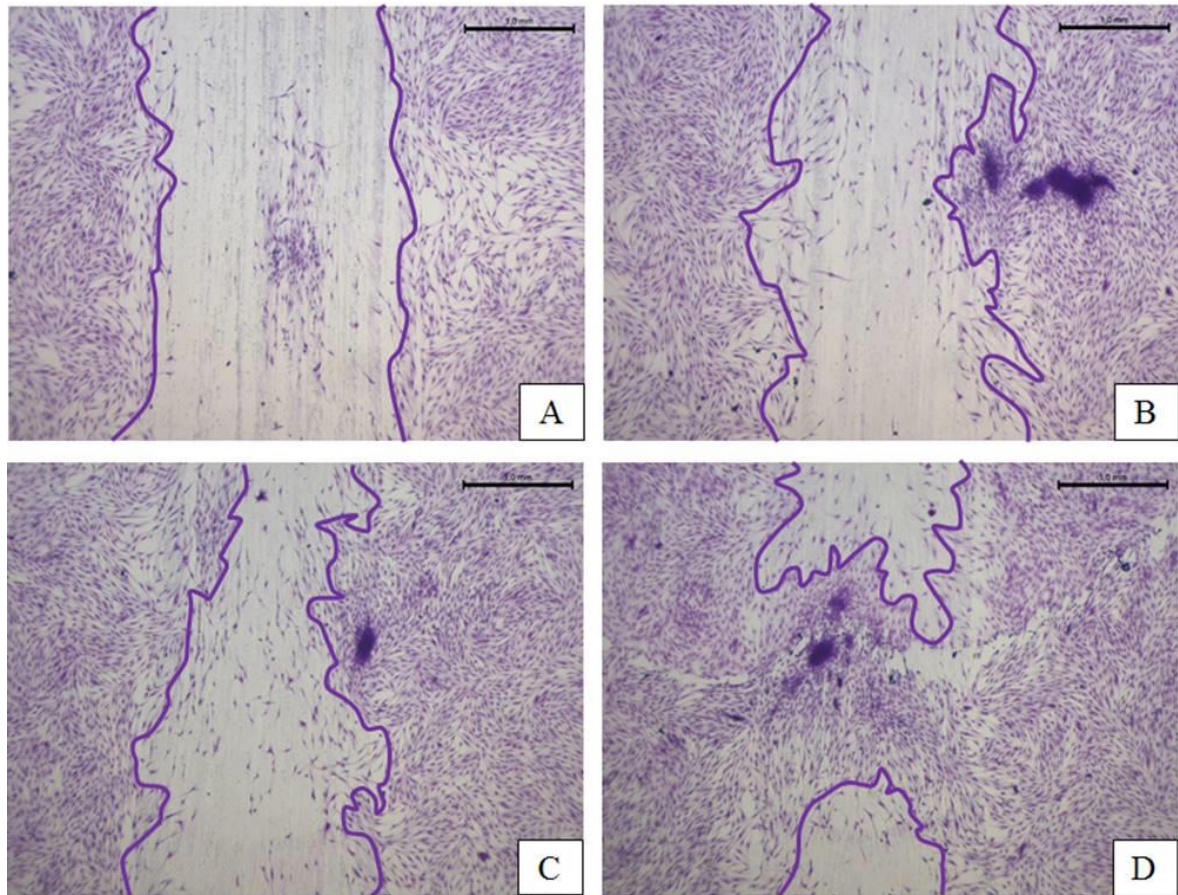
Autor: Luís Carlos Leal Santana.
Fonte: Autoria própria.

Figura 17 - Estereofotomicroscopia ilustrando o comportamento de fibroblastos gengivais 72h após a realização do arranhão in vitro, representados pela imagem **A** (controle; EtOH 0.1%), **B** (T 1nM), **C** (FLU) e **D** (T+FLU) (aumento focal de 2.5x). O gráfico mostra a diferença estatística entre o grupo controle e os grupos FLU e T+FLU ($p<0,001$), e entre o grupo T 1nM e os grupos FLU e T+FLU ($p<0,001$). As barras no gráfico indicam o *fold-change* da média e as linhas verticais o desvio-padrão. Letras iguais indicam a similaridade dos resultados.



Autor: Luís Carlos Leal Santana.
Fonte: Autoria própria.

Figura 18 - Estereofotomicroscopia ilustrando o comportamento de fibroblastos gengivais 72h após a realização do arranhão in vitro, representados pela imagem **A** (controle; EtOH 0.1%), **B** (T 1nM), **C** (FUL) e **D** (T+FUL) (aumento focal de 2.5x). O gráfico mostra a diferença estatística entre o grupo controle e os grupos FUL e T+FUL ($p<0,001$), entre o grupo T 1nM e os grupos FUL ($p<0,01$) e T+FUL ($p<0,001$), e entre os grupos FUL e T+FUL ($p<0,01$). As barras no gráfico indicam o *fold-change* da média e as linhas verticais o desvio-padrão. Letras iguais indicam a similaridade dos resultados.

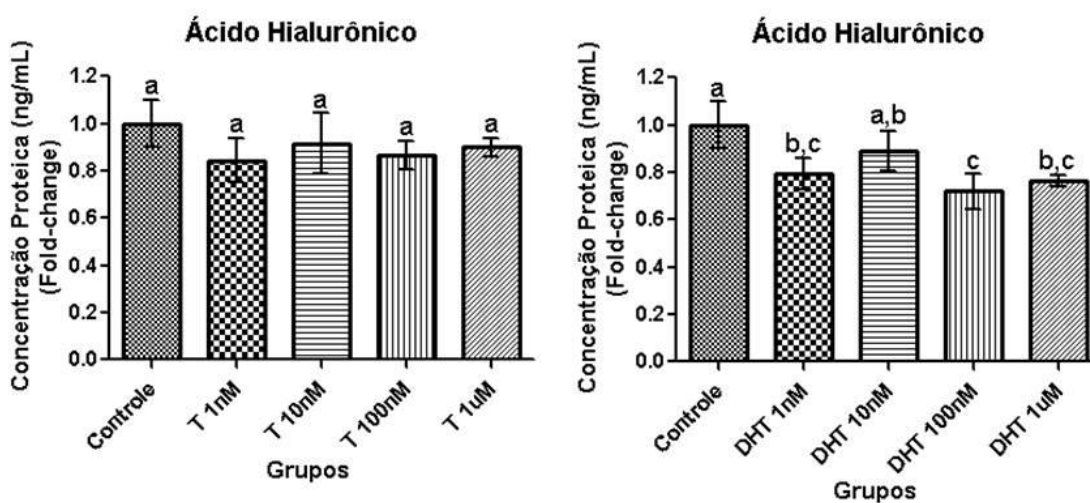


Autor: Luís Carlos Leal Santana.
Fonte: Autoria própria.

5.1.5 Avaliação da síntese de ácido hialurônico

Após a quantificação de ácido hialurônico por espectrofotometria, diferentes respostas foram observadas entre os tratamentos com andrógenos. Apesar da tendência à diminuição da síntese de ácido hialurônico, respostas similares foram observadas entre o controle e as diferentes concentrações de T. Por outro lado, as concentrações de DHT 1nM, 100nM e 1µM foram responsáveis por diminuir a síntese de ácido hialurônico em 21%, 29% e 24%, respectivamente, em comparação ao controle (Figura 19).

Figura 19 - Os gráficos abaixo ilustram a concentração de ácido hialurônico após o tratamento farmacológico com hormônios esteroides androgênicos. O gráfico à esquerda mostra a similaridade encontrada entre o controle e as concentrações de T ($p > 0,05$), enquanto que à direita, o gráfico mostra a diferença estatística entre o controle e as concentrações farmacológicas de DHT 1nM ($p < 0,01$), 100nM ($p < 0,001$) e 1µM ($p < 0,01$), além da diferença entre as concentrações de DHT 10nM e 100nM ($p < 0,05$).



Autor: Luís Carlos Leal Santana.

Fonte: Autoria própria.

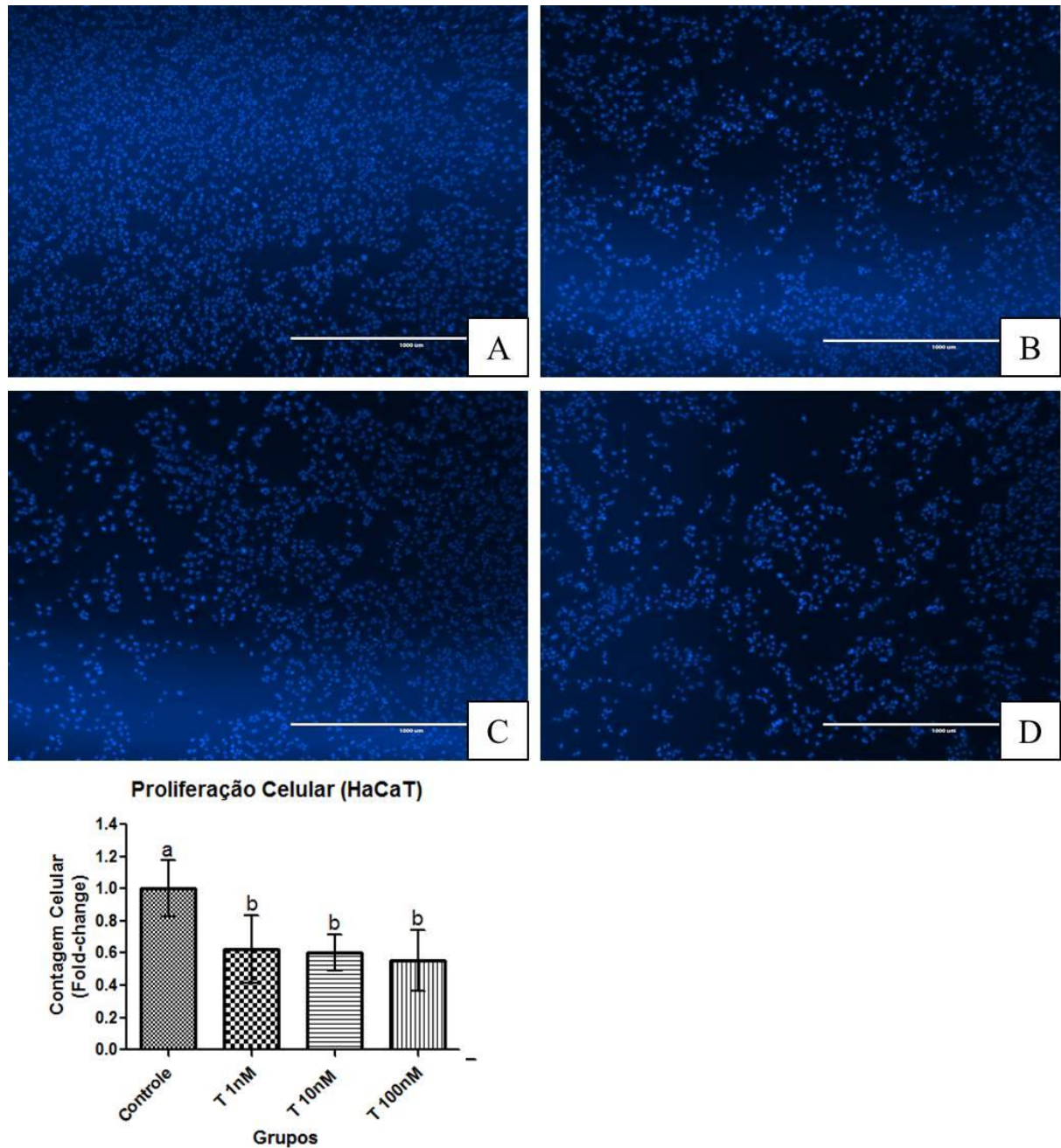
5.2 Células Epiteliais (HaCaT)

Nesta seção, serão apresentados os resultados referente aos ensaios de proliferação, atividade metabólica e migração celular da linhagem HaCaT de células epiteliais.

5.2.1 Avaliação da proliferação celular

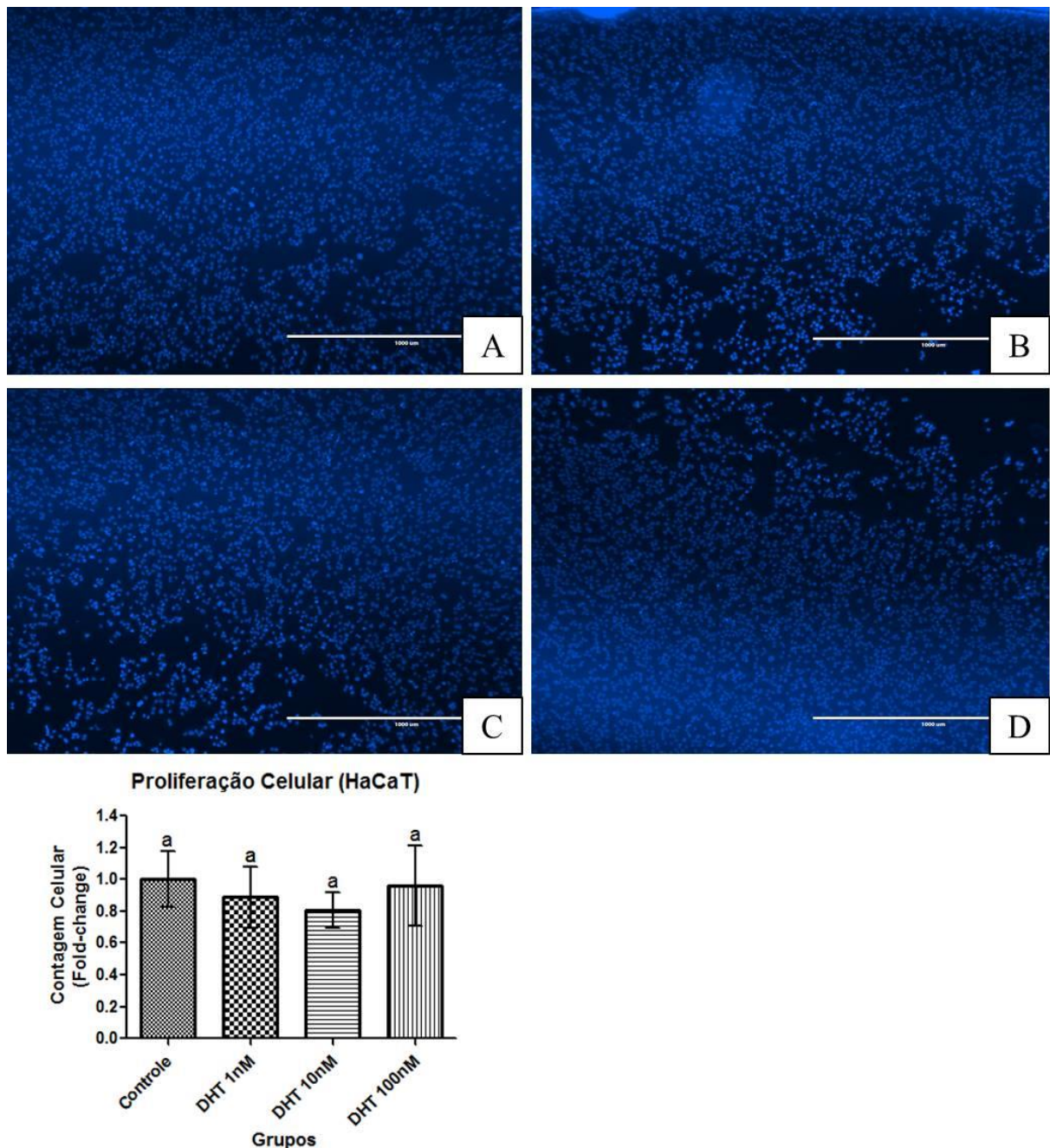
Diferentes respostas foram observadas após o tratamento com T e DHT. Comparado ao controle, as concentrações de T 1nM, 10nM e 100nM reduziram o número estimado de células epiteliais em 38%, 40% e 45%, respectivamente (Figura 20), enquanto que nenhuma diferença estatística foi observada em relação às concentrações crescentes de DHT 1nM, 10nM e 100nM ($p > 0,05$) (Figura 21).

Figura 20 - Fotomicrografia óptica de fluorescência (DAPI) ilustrando o núcleo de células HaCaT marcadas com Hoechst 33258 (em azul) 24h após o tratamento farmacológico com testosterona (T). A imagem **A** representa o grupo controle (EtOH 0.01%), enquanto que as imagens **B**, **C** e **D** representam as doses de T 1nM, 10nM, 100nM, respectivamente. O gráfico mostra a diferença estatística entre o grupo controle e as doses de T 1nM, 10nM ($p < 0,05$) e 100nM ($p < 0,01$). As barras no gráfico indicam o *fold-change* da média e as linhas verticais o desvio-padrão. Letras iguais indicam a similaridade dos resultados.



Autor: Luís Carlos Leal Santana.
Fonte: Autoria própria.

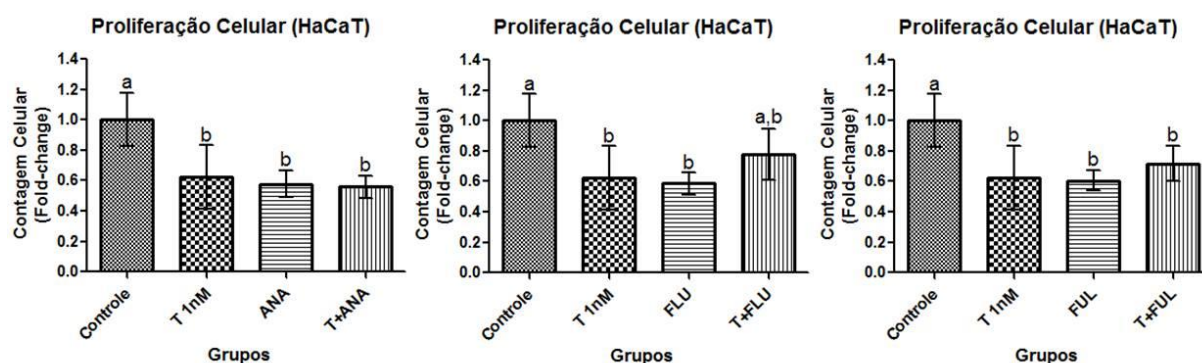
Figura 21 - Fotomicrografia óptica de fluorescência (DAPI) ilustrando o núcleo de células HaCaT marcadas com Hoechst 33258 (em azul) 24h após o tratamento farmacológico com di-hidrotestosterona (DHT). O grupo controle (EtOH 0.01%) está representado pela imagem **A**, enquanto que as imagens **B**, **C** e **D** representam as doses de DHT 1nM, 10nM, 100nM, respectivamente. As barras no gráfico indicam o *fold-change* da média e as linhas verticais o desvio-padrão. Letras iguais indicam a similaridade dos resultados.



Autor: Luís Carlos Leal Santana.
Fonte: Autoria própria.

Similar ao resultado observado no grupo T, os tratamentos com ANA, FLU e FUL exerceram influência na contagem de células HaCaT em cultura, sendo responsáveis por diminuir o número de células em 43%, 42% e 40%, respectivamente, quando comparados ao controle. Além disso, observou-se a redução na contagem de células epiteliais, em 45% e 29%, nos grupos T+ANA e T+FUL, respectivamente (Figura 22).

Figura 22 - O gráfico à esquerda mostra a diferença estatística entre o grupo controle (EtOH 0.01%) e os grupos anastrozol (ANA) e T+ANA ($p<0,01$). À direita, o gráfico mostra a diferença estatística entre o controle (EtOH 0.01%) e os grupos fulvestranto (FUL) ($p<0,01$) e T+FUL ($p<0,05$). E o gráfico centralizado mostra a diferença estatística entre o controle (EtOH 0.01%) e o grupo flutamida (FLU) ($p<0,01$). As barras dos gráficos representam a média e as linhas verticais o desvio-padrão dos fármacos administrados sobre células HaCaT em cultura. Letras iguais representam a similaridade dos resultados encontrados.

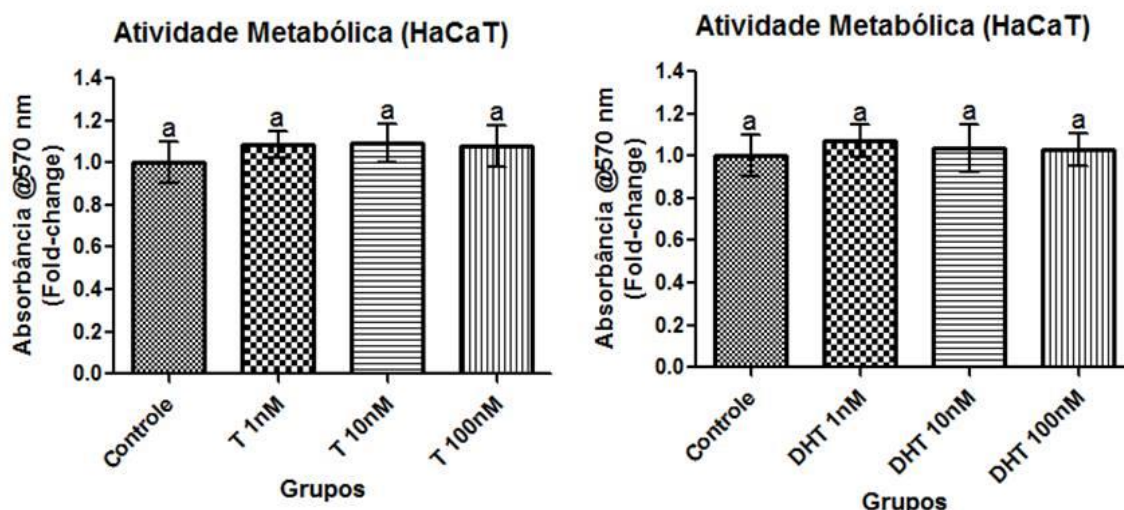


Autor: Luís Carlos Leal Santana.
Fonte: Autoria própria.

5.2.2 Avaliação da atividade metabólica

Em relação à atividade metabólica, nenhuma diferença estatística ($p>0,05$) foi observada após o período de tratamento com concentrações crescentes de T ou DHT (Figura 23), ou após o tratamento com o inibidor da enzima aromatase, inibidor do receptor de andrógeno ou o inibidor do receptor de estrógeno (Figura 24).

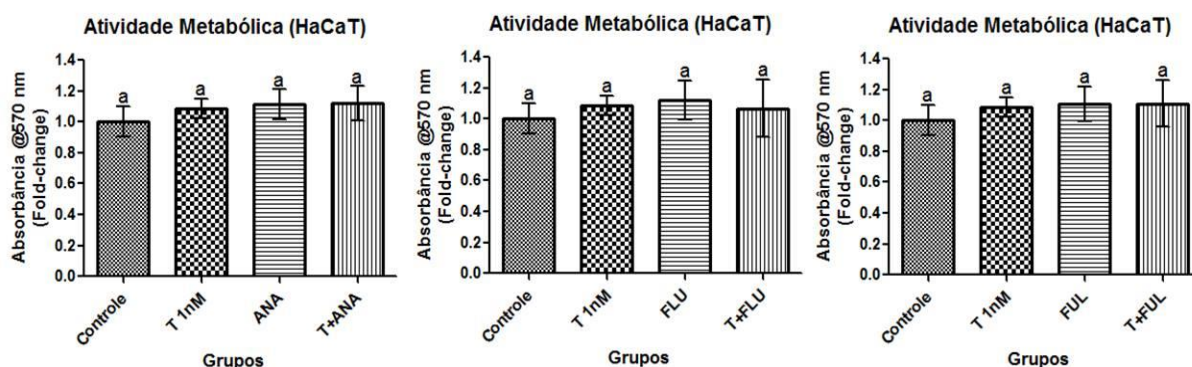
Figura 23 - Os gráficos abaixo ilustram a absorbância do sobrenadante celular 24h após o tratamento farmacológico com T e DHT. À esquerda, gráfico mostra os resultados obtidos após o tratamento com concentrações crescentes de T 1nM, 10nM e 100nM, enquanto que o gráfico à direita mostra os resultados obtidos após a administração de DHT 1nM, 10nM e 100nM, não havendo diferenças estatísticas quando comparados ao grupo controle (EtOH 0.01%) ($p>0,05$). As barras no gráfico indicam o *fold-change* da média e as linhas verticais o desvio-padrão. Letras iguais indicam a similaridade dos resultados.



Autor: Luís Carlos Leal Santana.

Fonte: Autoria própria.

Figura 24 - Os gráficos abaixo ilustram a absorbância do sobrenadante celular 24h após o tratamento farmacológico com anastrozol (ANA), flutamida (FLU) e fulvestranto (FUL), além de suas respectivas associações à T. O gráfico à esquerda mostra os resultados obtidos após o tratamento com ANA e T+ANA. À direita, o gráfico mostra os resultados obtidos após a administração de FLU e T+FLU, enquanto que o gráfico centralizado mostra os resultados obtidos após a utilização de FUL e T+FUL, não havendo diferenças estatísticas quando comparados ao grupo controle (EtOH 0.01%) ($p>0,05$). As barras no gráfico indicam o *fold-change* da média e as linhas verticais o desvio-padrão. Letras iguais indicam a similaridade dos resultados.



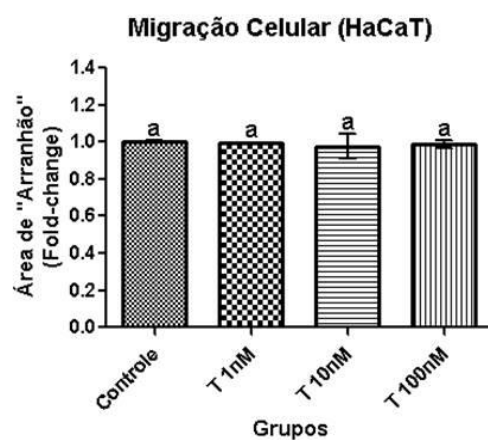
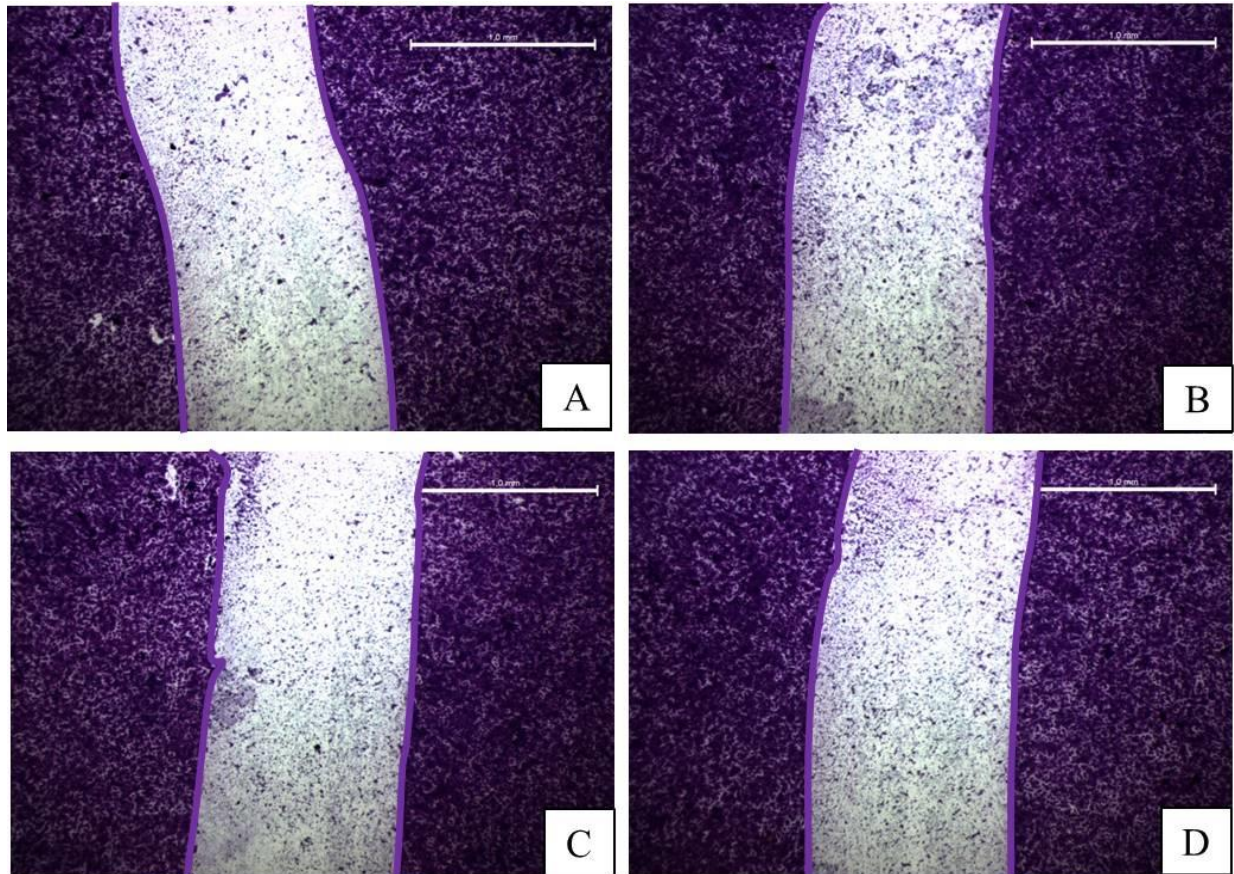
Autor: Luís Carlos Leal Santana.

Fonte: Autoria própria.

5.2.3 Avaliação da migração celular - “*Scratch assay*”

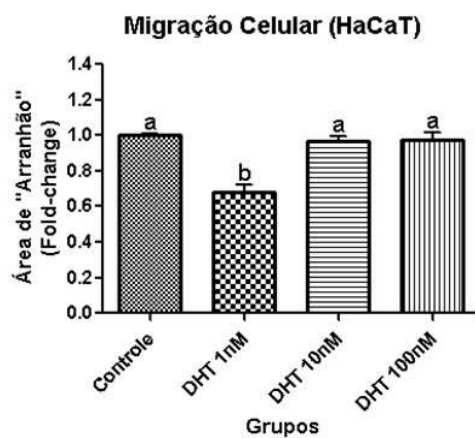
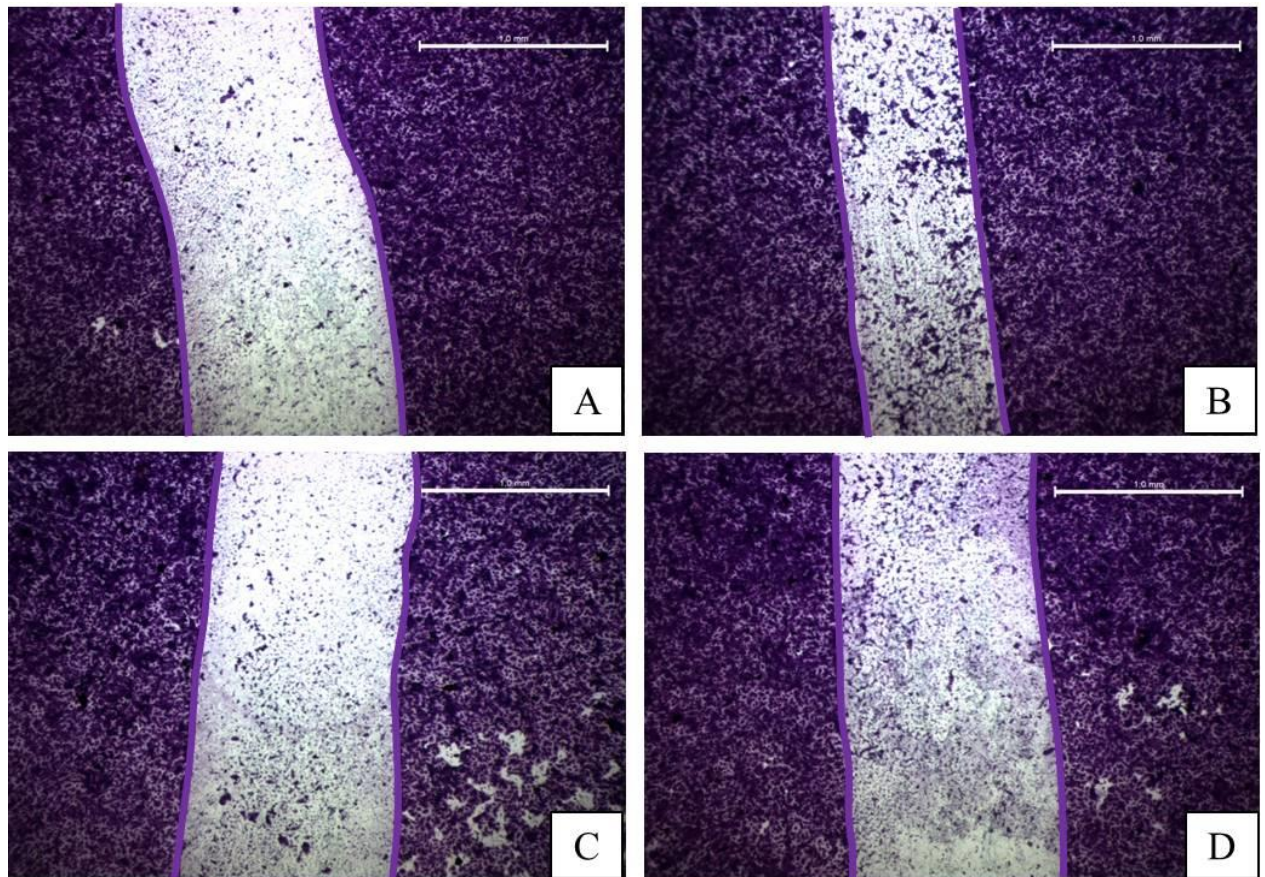
De um modo geral, observou-se que, entre os andrógenos, o tratamento com diferentes concentrações de T não influenciou a capacidade de células HaCaT repovoar a área de arranhão (Figura 25). Apenas a administração farmacológica de DHT 1nM foi responsável por diminuir a área de arranhão em 32%, comparado ao grupo controle (Figura 26).

Figura 25 - Estereofotomicroscopia ilustrando o comportamento de células HaCaT 24h após a realização do arranhão in vitro. A imagem **A** representa o grupo controle (EtOH 0.01%), enquanto que as imagens **B**, **C**, **D** representam respectivamente os grupos T 1nM, T 10nM e T 100nM (aumento focal de 2.5x). O gráfico mostra a semelhança ente o controle e o tratamento com concentrações crescentes de T ($p>0,05$). As barras no gráfico indicam o *fold-change* da média e as linhas verticais o desvio-padrão. Letras iguais indicam a similaridade dos resultados.



Autor: Luís Carlos Leal Santana.
 Fonte: Autoria própria.

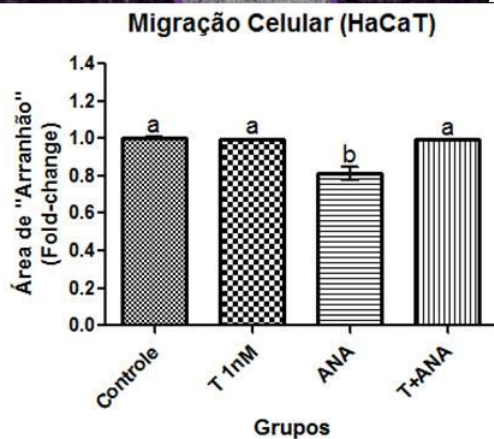
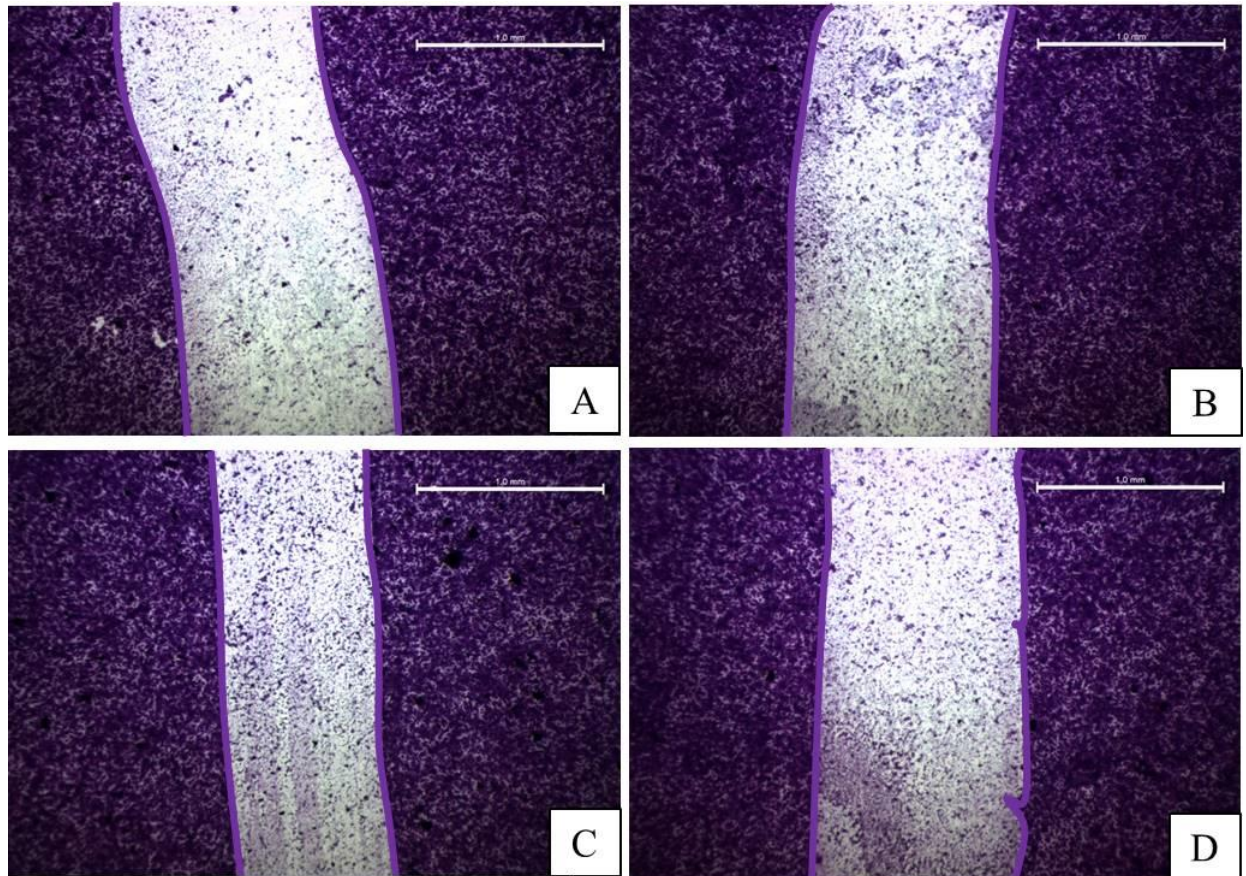
Figura 26 - Estereofotomicroscopia ilustrando o comportamento de células HaCaT 24h após a realização do arranhão in vitro. A imagem **A** representa o grupo controle (EtOH 0.01%), enquanto que as imagens **B**, **C**, **D** representam respectivamente os grupos de DHT 1nM, 10nM e 100nM (aumento focal de 2.5x). O gráfico mostra a semelhança entre o controle e o tratamento com concentrações de DHT 1nM ($p < 0,001$), além da diferença entre o grupo DHT 1nM e às doses de DHT 10nM e 100nM ($p < 0,001$). As barras no gráfico indicam o *fold-change* da média e as linhas verticais o desvio-padrão. Letras iguais indicam a similaridade dos resultados.



Autor: Luís Carlos Leal Santana.
Fonte: Autoria própria.

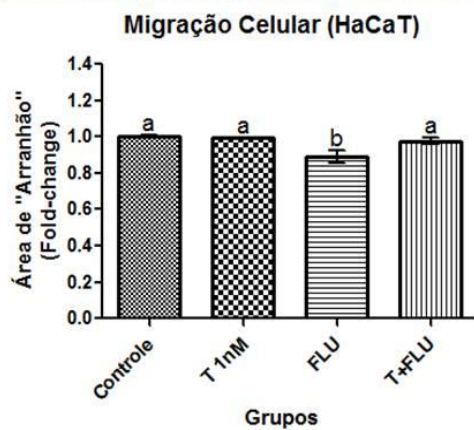
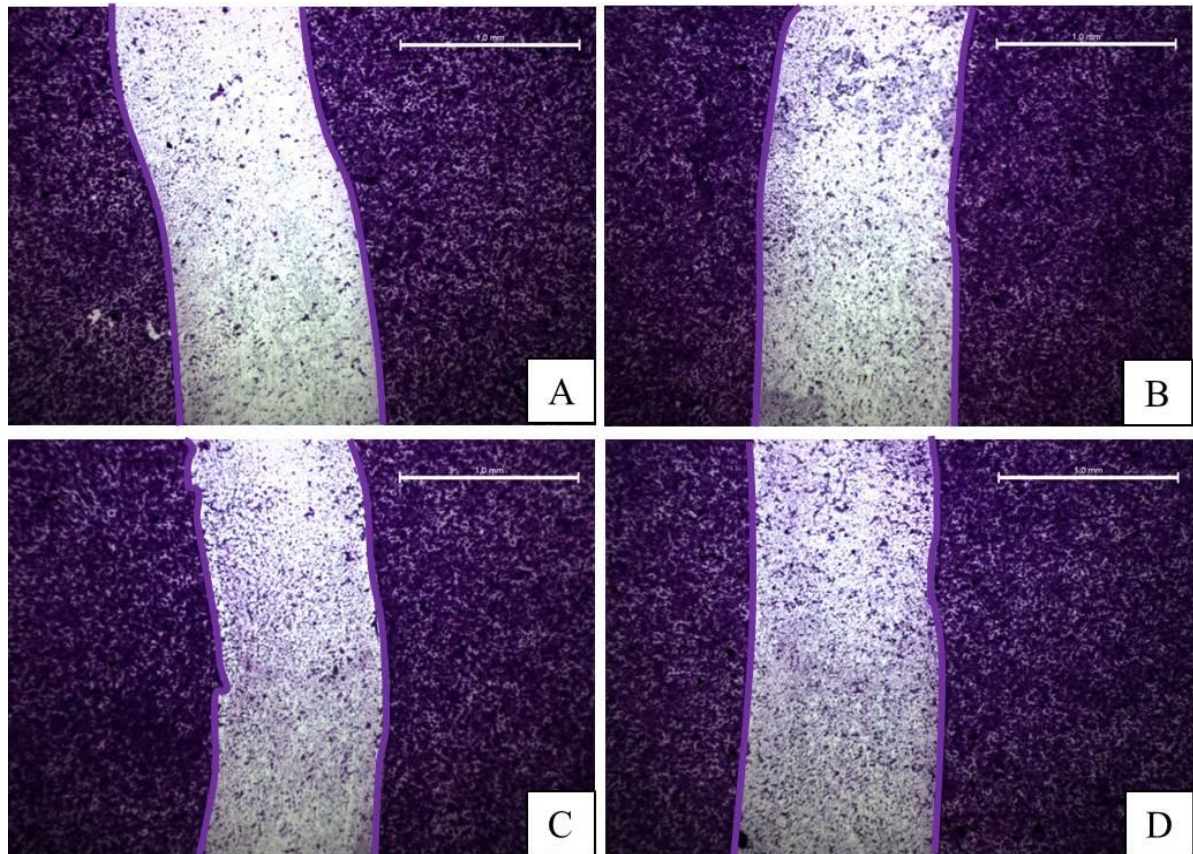
Em relação aos inibidores de receptores de hormônios sexuais e o inibidor da enzima aromatase, verificou-se que, comparado ao controle, o tratamento com ANA foi responsável por diminuir a área de arranhão na monocamada de células epiteliais em 19% (Figura 27), sendo este efeito observado de forma similar no grupo FLU (Figura 28), não havendo diferenças estatísticas em relação ao grupo FUL (Figura 29) ou às associações com T ($p>0,05$).

Figura 27 - Estereofotomicroscopia demonstrando o comportamento de células HaCaT 24h após a realização do arranhão in vitro. A imagem **A** representa o grupo controle (EtOH 0.01%), enquanto que as imagens **B**, **C** e **D** representam, respectivamente, os grupos T 1nM, ANA e T+ANA (aumento focal de 2.5x). O gráfico mostra a diferença estatística entre o grupo ANA e os grupos controle, T 1nM e T+ANA ($p < 0,001$). As barras no gráfico indicam o *fold-change* da média e as linhas verticais o desvio-padrão. Letras iguais indicam a similaridade dos resultados.



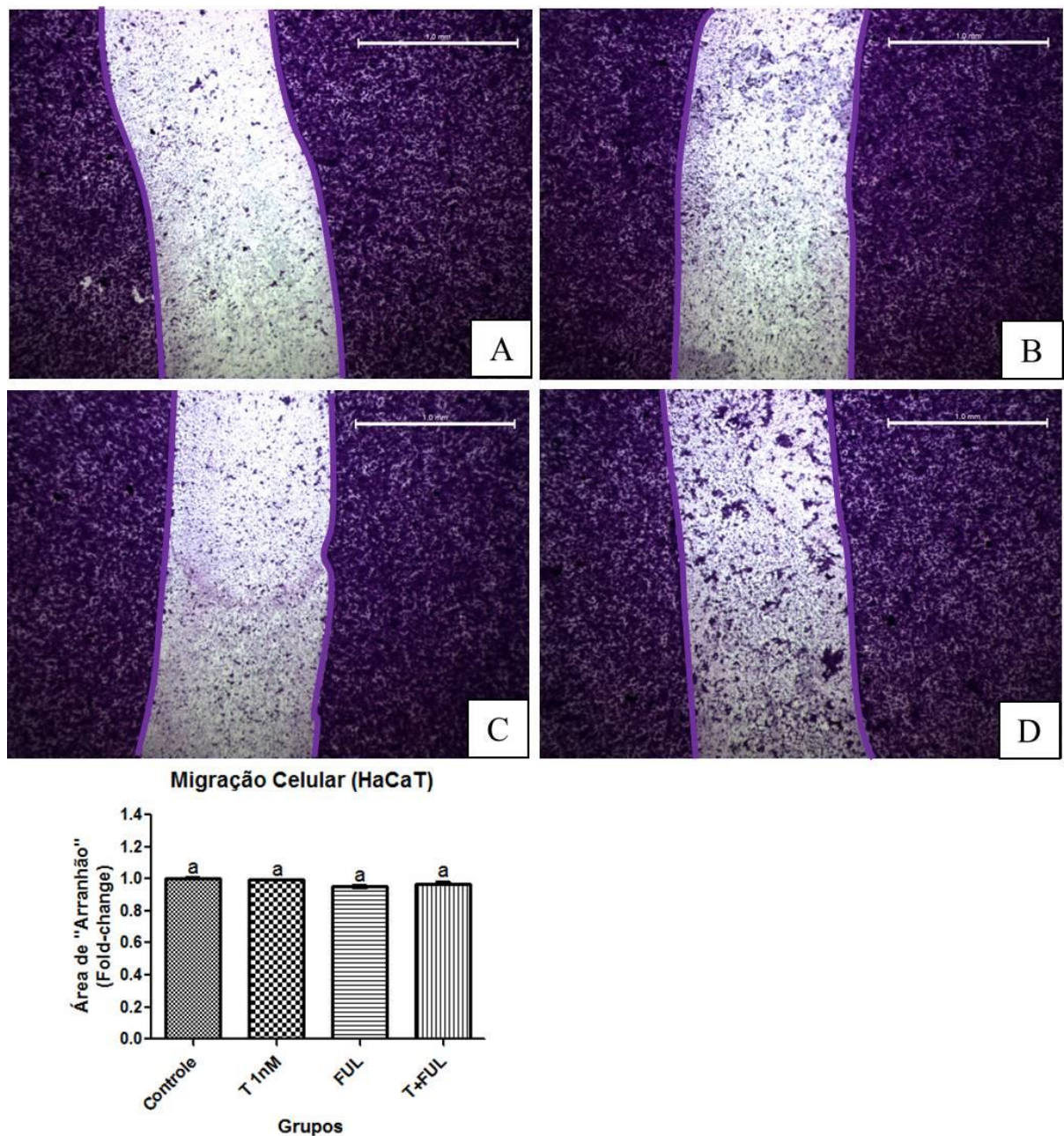
Autor: Luís Carlos Leal Santana.
Fonte: Autoria própria.

Figura 28 - Estereofotomicroscopia ilustrando o comportamento de células HaCaT 24h após a realização do arranhão in vitro. A imagem **A** representa o grupo controle (EtOH 0.01%), enquanto que as imagens **B**, **C** e **D** representam, respectivamente, os grupos T 1nM, FLU e T+FLU (aumento focal de 2.5x). O gráfico mostra a diferença estatística entre o grupo FLU e os grupos controle (ANOVA; $p < 0,001$), T 1nM e T+FLU ($p < 0,01$). As barras no gráfico indicam o *fold-change* da média e as linhas verticais o desvio-padrão. Letras iguais indicam a similaridade dos resultados.



Autor: Luís Carlos Leal Santana.
 Fonte: Autoria própria.

Figura 29 - Estereofotomicroscopia ilustrando o comportamento de células HaCaT 24h após a realização do arranhão in vitro. A imagem **A** representa o grupo controle (EtOH 0.01%), enquanto que as imagens **B**, **C** e **D** representam, respectivamente, os grupos T 1nM, FUL e T+FUL (aumento focal de 2.5x). As barras no gráfico indicam o *fold-change* da média e as linhas verticais o desvio-padrão. Letras iguais indicam a similaridade dos resultados.



Autor: Luís Carlos Leal Santana.
Fonte: Autoria própria

6 DISCUSSÃO

As ações de hormônios esteroides androgênicos sobre diferentes órgãos e tecidos, incluindo o periodonto, são frequentemente descritas tanto em humanos quanto em animais experimentais (Ozcelik et al.⁶², 2006; Famili et al.²², 2007; Engeland et al.²⁰, 2008; Steffens et al.⁷⁹, 2014; Steffens et al.⁷⁷, 2015; Wang et al.⁹⁴, 2015). Recentemente, verificou-se que níveis subfisiológicos e suprafisiológicos de T foram responsáveis pelo aumento da área gengival de ratos machos (Steffens et al.⁷⁸, 2012), sugerindo a ação de andrógenos sobre eventos celulares e moleculares de fibroblastos e células epiteliais. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo principal verificar os efeitos da T e DHT sobre a proliferação e atividade de fibroblastos gengivais humano e células epiteliais HaCaT em cultura celular.

O embasamento científico para o uso de diferentes concentrações de T e DHT utilizadas no presente trabalho advém do estudo realizado por Steffens et al.⁷⁹ (2014), quando verificaram que níveis normais (4.42 ± 2.9 nM), baixos (0.74 ± 0.2 nM) e elevados (111.10 ± 32.4 nM) de testosterona sérica exerciam efeitos sobre os tecidos periodontais. Entretanto, deve se considerar que as ações específicas da T sobre os diversos tecidos do organismo podem ser confundidas com a do estradiol (E_2) ou de DHT, uma vez que diversas células podem expressar o gene codificador da enzima aromatase, responsável por converter T em E_2 (Harada³¹, 1992; Nawata et al.⁵⁸, 1995; Simpson⁷³, 2003), e 5α -redutase, enzima responsável pela conversão de T em DHT (Li et al.⁴², 1995; Aggarwal et al.¹, 2010). Sob esta perspectiva, também foram avaliados o impacto de ANA, FLU, FUL, e suas respectivas associações à T, sobre eventos celulares e moleculares de fibroblastos e células epiteliais.

Para a análise da proliferação celular, o método fluorimétrico foi selecionado para este estudo, uma vez que é uma técnica que tem sido utilizada para a identificação e quantificação de diferentes tipos celulares (Papadimitriou, Lelkes⁶⁴, 1993; Zhang, Kiechle¹⁰⁰, 1998; Murphy et al.⁵⁶, 2010).

Os resultados do presente estudo mostram o aumento do número estimado de fibroblastos gengivais a partir do tratamento com a maior concentração de T, e com diferentes concentrações de DHT (10nM, 100nM e 1µM). Apesar de Gilliver et al.²⁴ (2009) terem demonstrado os efeitos inexpressíveis da DHT sobre a proliferação de fibroblastos da derme, foram confirmados os achados de outros autores que relataram os efeitos bioestimulatórios da T e de DHT sobre a proliferação de fibroblastos gengivais humanos em cultura celular

(Coletta et al.¹⁷, 2002; Almeida et al.², 2005). A divergência entre o presente resultado e aquele encontrado por Gilliver et al.²⁴ (2009) pode ser explicada pela diferença entre os tipos celulares utilizados em cada estudo, uma vez que a variação da expressão do receptor de andrógeno pode ocorrer entre diferentes espécies (Jahan et al.³⁶, 2015). Além disso, o fato de outras concentrações de DHT terem exercido efeito sobre a proliferação de fibroblastos é fundamentado pela maior afinidade que a DHT tem ao receptor de andrógeno (Aggarwal et al.¹, 2010).

Embora, no presente estudo, o efeito da concentração de 1nM de T tenha sido similar àquele observado no grupo controle, a associação deste andrógeno ao inibidor não-esteroidal da enzima aromatase promoveu o aumento do número estimado de fibroblastos. Neste caso, pode se aventar a hipótese de que o resultado obtido esteja associado, ao menos em parte, ao mecanismo de inibição de T em E₂ promovido pelo ANA (Hong et al.³⁴, 2011). Além disso, foi demonstrado, pela primeira vez, o efeito isolado de um inibidor não-esteroidal da enzima aromatase sobre fibroblastos de gengiva humana, onde o tratamento farmacológico com 10nM de ANA foi responsável por estimular a proliferação dos fibroblastos *in vitro*. Os efeitos *in vivo* da inibição da enzima aromatase foram anteriormente verificados por (Reynolds et al.⁶⁸, 2004), que relataram a ocorrência de hiperplasia gengival em fêmeas após o tratamento com letrozol, cuja ação, similar ao ANA, resulta na inibição da conversão de T em E₂ (Hong et al.³⁴, 2011).

Apesar de, no presente estudo, não terem sido avaliados os níveis de T e E₂ em sobrenadante celular, ou a expressão gênica da enzima aromatase, na análise conjunta dos resultados relativos à proliferação de fibroblastos, é possível sugerir que: 1) os efeitos da T podem ser modulados a partir da sua associação ao ANA; 2) a inibição da enzima aromatase por ANA pode desencadear eventos relacionados à proliferação de fibroblastos. Entretanto, por se tratar de um resultado inédito, outros estudos devem ser elaborados para elucidar os mecanismos de ação de ANA sobre as vias envolvidas na proliferação de fibroblastos gengivais humano em cultura celular.

Para análise da atividade metabólica celular, foi realizado o ensaio colorimétrico Alamar Blue[®], uma vez que o método não se mostra tóxico para as células e, diferentemente do MTT, não necessita da lise celular para obter os dados relativos ao metabolismo das células *in vitro* (O'Brien et al.⁵⁹, 2000).

No atual estudo foi demonstrado que tanto concentrações de T como de DHT suscitaram o aumento da atividade metabólica de fibroblastos gengivais em cultura celular, assim como os tratamentos farmacológicos com ANA, FLU, FUL, e suas respectivas associações à T. Em contrapartida, (Pomari et al.⁶⁷, 2015) relataram a diminuição da viabilidade de fibroblastos dérmicos *in vitro* após o tratamento com concentrações crescentes de T, E₂, e ANA. O contraste entre estes resultados pode ser explicado por diferenças metodológicas, uma vez que no presente estudo, a atividade metabólica foi avaliada a partir do método colorimétrico Alamar Blue[®] sobre fibroblastos gengivais, enquanto que (Pomari et al.⁶⁷, 2015) verificaram a viabilidade de fibroblastos da derme pelo método MTT. Segundo (Hamid et al.³⁰, 2004), o Alamar Blue[®] representa um método homogêneo e levemente mais sensível que o MTT.

Ainda, a hipótese sugerida a cerca dos resultados de atividade metabólica obtidos pela associação entre T e ANA pode ser fundamentada pela inibição da conversão de T em E₂ (Hong et al.³⁴, 2011), e/ou em virtude da ação direta de ANA sobre eventos celulares, conforme observado no ensaio de proliferação celular. A causa para o aumento do metabolismo dos fibroblastos observado a partir da associação de T e FUL pode ser devido não apenas ao bloqueio do receptor de estrógeno, mas também, pelo efeito incitante de andrógenos sobre os fibroblastos gengivais humanos (Coletta et al.¹⁷, 2002; Almeida et al.², 2005). Além disso, o resultado do presente estudo mostra que a inibição do receptor de andrógeno por FLU foi responsável pelo aumento da atividade celular, sugerindo que o metabolismo de fibroblastos pode ser regulado não apenas via receptor de estrógeno, mas também pelo receptor de andrógeno. Contudo, deve-se salientar a necessidade de que outros estudos sejam realizados para verificar os efeitos *in vitro* de antiandrógenos, antiestrógenos e inibidores da aromatase sobre a atividade metabólica de fibroblastos gengivais de origem humana.

O ensaio de arranhão *in vitro* foi o método selecionado para análise da capacidade de fibroblastos gengivais repovoarem a área de células removidas por meio de uma pipeta, uma vez que é uma metodologia que tem sido comumente utilizada para a análise da migração de fibroblastos gengivais em cultura celular (Hoang et al.³³, 2000; Lackler et al.³⁹, 2000; Mumford et al.⁵⁵, 2001; Basso et al.⁶, 2012).

De modo geral, relatos conflitantes têm sido observados na literatura em relação aos efeitos de hormônios esteroides androgênicos sobre a atividade migratória de fibroblastos em

cultura celular. Diferente dos resultados encontrados por Gilliver et al.²⁴ (2009) e Chung et al.¹⁵ (2014) que relataram os efeitos exíguos de andrógenos sobre a migração de fibroblastos da derme, e a migração de fibroblastos do tecido cardíaco, respectivamente, foi demonstrado no atual estudo que tanto a T quanto a DHT foram responsáveis pelo maior repovoamento de fibroblastos gengivais humano. Resultados similares foram descritos anteriormente por outros autores que, de modo geral, demonstraram os efeitos incitantes de andrógenos sobre a migração de fibroblastos embrionários (Castoria et al.¹², 2011) e fibroblastos da derme (Pomari et al.⁶⁷, 2015). Contudo, há de se considerar que, no presente estudo, os resultados de repovoamento celular podem ter sido influenciados pela atividade mitótica dos fibroblastos, uma vez que, diferente de Gilliver et al.²⁴ (2009), a proliferação celular não foi inibida no ensaio de arranhão in vitro.

Além dos efeitos bioestimulatórios promovidos por andrógenos, no presente estudo foi demonstrada a modulação dos efeitos da T após sua associação ao ANA, FLU ou FUL. Ainda que não tenha sido avaliada a expressão gênica da enzima aromatase ou do receptor de estrógeno, na análise conjunta dos resultados relativos ao repovoamento de fibroblastos, pode se aventar as respectivas hipóteses para os tratamentos com T+ANA e T+FUL: 1) os efeitos de andrógenos podem ter sido acentuados devido a maior disponibilidade de T em meio de cultura, uma vez que o ANA inibe a redução de T em E₂ (Hong et al.³⁴, 2011); 2) o bloqueio farmacológico do receptor de estrógeno por FUL pode ter resultado apenas na atividade promovida pela ligação da T ao receptor de andrógeno, a qual foi a responsável por aumentar a proliferação, atividade metabólica e o repovoamento dos fibroblastos no estudo atual. Além disso, fibroblastos gengivais humanos possuem o mecanismo necessário para metabolizar a T e androstenediona via ação da enzima 5 α -redutase (Soory, Ahmad⁷⁵, 1997; Soory, Virdi⁷⁶, 1998).

Curiosamente, os resultados do ensaio de arranhão in vitro também mostram que, independente da associação à T, o tratamento farmacológico com FLU foi responsável por promover o repovoamento dos fibroblastos gengivais em cultura celular. Neste caso, pode se aventar a hipótese de que este evento pode ser regulado não apenas via receptor de estrógeno, mas também por meio do receptor de andrógeno. Assim, com base nestes resultados, pode se aventar a hipótese que a inibição da enzima aromatase e o bloqueio farmacológico de receptores de andrógenos e estrógenos podem regular os mecanismos relacionados à proliferação e migração de fibroblastos. Não obstante, ressalta-se a necessidade de que

pesquisas sejam realizadas no sentido de se avaliar os mecanismos envolvidos na modulação dos efeitos de T por ANA, FLU e FUL sobre a migração de fibroblastos gengivais humano em cultura celular.

Outra característica que foi avaliada no atual estudo foi a síntese de ácido hialurônico no sobrenadante dos fibroblastos em cultura celular. Foi demonstrado que fibroblastos gengivais humanos expressam as isoenzimas hialuronan sintase, as quais são responsáveis pela síntese de ácido hialurônico (Hashikawa et al.³², 2006). Além disso, estudos tem demonstrado que a expressão do gene responsável pela síntese de colágeno do tipo I por fibroblastos gengivais pode ser influenciada pela ação de moléculas proteicas tais como o TGF- β 1, IL-6 e IFN- γ (Martelli-Junior et al.⁴⁸, 2003), e que a expressão gênica de ácido hialurônico por fibroblastos murinos pode ser regulada via ação da IL-6 e seu receptor solúvel sIL-6R (Mueller et al.⁵⁴, 2013). Os resultados do estudo atual mostram que, entre os tratamentos com os andrógenos, apenas as concentrações de DHT foram responsáveis pela diminuição da síntese de ácido hialurônico por fibroblastos gengivais in vitro. Este resultado pode ser fundamentado pelo fato de a DHT possuir maior afinidade ao receptor de andrógeno, quando comparada à T (Aggarwal et al.¹, 2010). Embora, no presente estudo, não tenha sido avaliada a síntese de IL-6 em sobrenadante, pode se aventar a hipótese de que a diminuição da síntese de ácido hialurônico após exposição às diferentes concentrações de DHT pode ter ocorrido via modulação da expressão gênica da IL-6, conforme demonstrado anteriormente por outros autores (Parkar et al.⁶⁵, 1998; Gornstein et al.²⁶, 1999; Coletta et al.¹⁷, 2002). Todavia, uma vez que o hialuronan representa um dos principais componentes da matriz extracelular (Mueller et al.⁵⁴, 2013) mais estudos devem ser realizados para elucidar os mecanismos de ação de andrógenos sobre a expressão gênica das isoenzimas hialuronan sintases.

Conforme demonstrado por Steffens et al.⁷⁸ (2012), a alteração dos níveis fisiológicos de T foi responsável pelo espessamento do epitélio gengival de ratos no modelo de doença periodontal induzida por ligaduras. Assim, com o objetivo de tentar elucidar tais achados, e sob a hipótese de que hormônios esteroides androgênicos podem exercer efeitos sobre o tecido epitelial, células epiteliais HaCaT foram expostas às diferentes concentrações de T e DHT, além do tratamento com antiandrógenos, antiestrógenos e o inibidor não-esteroidal da enzima aromatase.

Os resultados do presente estudo mostram que o tratamento farmacológico com concentrações crescentes de T foi responsável por inibir a proliferação de células epiteliais HaCaT em cultura celular. Ainda que Toraldo et al.⁸⁹ (2012) tenham relatado os efeitos exíguos da T sobre a proliferação de queratinócitos de linhagem in vitro, foram confirmados os resultados do estudo anterior que demonstrou o efeito inibitório da T sobre a proliferação de queratinócitos epidérmicos em cultura celular (Pan et al.⁶³, 1999). Rejeitando-se a tendência do resultado, nenhum efeito foi observado a partir do tratamento com diferentes concentrações de DHT, andrógeno metabolicamente mais ativo que a T, e de maior afinidade ao receptor de andrógeno (Mawhinney, Mariotti⁵⁰, 2013). O contraste entre o resultado do presente estudo e àquele observado por Toraldo et al.⁸⁹ (2012) pode ser explicado por diferenças metodológicas, uma vez que a proliferação de células HaCaT foi determinada a partir da contagem do número estimado de células em microscópio óptico de transmissão, enquanto que Toraldo et al.⁸⁹ (2012) determinaram a proliferação dos queratinócitos de linhagem a partir do ensaio MTT, e por fluorescência em espectrofotômetro. Além disso, constatou-se a diminuição do número de células HaCaT após os tratamentos com ANA, FLU e FUL, e com as associações entre T e ANA ou T e FUL. Apesar de no presente estudo não ter sido avaliada a expressão gênica da enzima aromatase ou de receptores de hormônios sexuais das células HaCaT, as hipóteses que podem conduzir à explicação sobre os efeitos inibitórios das respectivas associações são: 1) uma vez que o ANA inibe a conversão da T em E₂ (Hong et al.³⁴, 2011), os efeitos inibitórios da T podem ter sido acentuados devido a sua maior disponibilidade em meio de cultura; 2) o bloqueio farmacológico do receptor de estrógeno por FUL pode ter resultado apenas na atividade promovida pela ligação da T ao receptor de andrógeno, a qual foi responsável por diminuir a proliferação de células epiteliais HaCaT in vitro. Quanto aos efeitos dos inibidores farmacológicos, pode se aventar a hipótese de que a inibição da enzima aromatase e o bloqueio farmacológico de receptores de andrógenos e estrógenos podem regular vias celulares relacionadas à proliferação de células epiteliais HaCaT. Contudo, por se tratar de um trabalho inédito, mais estudos devem ser realizados no sentido de se avaliar os mecanismos envolvidos na modulação dos efeitos de T por ANA e FUL, além dos efeitos de antiandrógenos, antiestrógenos e inibidores não-esteroidais da enzima aromatase sobre a proliferação de células HaCaT em cultura celular.

Assim como nos fibroblastos de gengiva humana, a atividade metabólica das células HaCaT foi determinada a partir do ensaio colorimétrico Alamar Blue[®]. Queratinócitos

epidérmicos de origem mamaria e células epiteliais HaCaT possuem os mecanismos necessários para a síntese de precursores de hormônios esteroides sexuais. Desta forma, a linhagem HaCaT de células epiteliais constitui modelo adequado para se avaliar os efeitos de hormônios esteroides sexuais e a regulação de enzimas envolvidas no metabolismo de hormônios sexuais (Gingras et al.²⁵, 2003).

Na análise do metabolismo celular, o resultado do presente estudo mostra que nenhum tratamento proposto foi responsável por aumentar ou diminuir a atividade de células epiteliais HaCaT em cultura celular. Em partes, tais resultados confirmam os achados de Toraldo et al.⁸⁹ (2012) que demonstraram os efeitos escassos do tratamento com T, FLU, ou suas respectivas associações farmacológicas, sobre a atividade metabólica de células HaCaT in vitro. Por outro lado, ao avaliarem os efeitos da T, E₂, ANA e de precursores hormonais, sobre a atividade metabólica de queratinócitos epidérmicos, Pomari et al.⁶⁷ (2015) demonstraram por meio do ensaio MTT que a diminuição da viabilidade dos queratinócitos pode ocorrer a partir da exposição às diferentes concentrações de T e E₂, e de precursores hormonais. Estes resultados devem ser interpretados com cautela, uma vez que, diferentemente de queratinócitos primários, células HaCaT representam a linhagem de células epiteliais aneuplóides, associadas a alterações cromossômicas (Boukamp et al.¹¹, 1988). Assim, mais estudos devem ser conduzidos com a finalidade de se avaliar a ação de andrógenos, de inibidores não-esteroidais da enzima aromatase e de inibidores não-esteroidais de receptores de hormônios sexuais sobre a atividade metabólica de células epiteliais HaCaT em cultura celular.

Por fim, como observado nos estudos com fibroblastos, relatos conflitantes têm sido observados na literatura em relação aos efeitos de hormônios esteroides androgênicos sobre a atividade migratória de queratinócitos epidérmicos em cultura celular.

De modo geral, no presente estudo foi observado o efeito exíguo de concentrações crescentes de T sobre o repovoamento de queratinócitos in vitro. Além disso, dentre os tratamentos com DHT, apenas a concentração de 1nM foi responsável por diminuir a área de arranção realizada sobre a monocamada das células epiteliais HaCaT em cultura celular. Embora tenham sido demonstrados os efeitos inibitórios de andrógenos sobre a migração de células epiteliais in vitro (Gilliver et al.²⁴, 2009; Toraldo et al.⁸⁹, 2012), um estudo recente demonstrou a ação biológica da T, onde a concentração de 50nM promoveu a migração de queratinócitos epidérmicos em cultura celular, sendo este efeito completamente revertido pela administração de ANA que, tão somente, não interviu na migração das células epiteliais

(Pomari et al.⁶⁷, 2015). Em contrapartida, no presente estudo foi demonstrado que entre os tratamentos com ANA, FLU, FUL e suas respectivas associações à T, apenas o ANA e o FLU foram responsáveis pelo maior repovoamento das células HaCaT in vitro. Em parte, resultados semelhantes foram observados in vivo após a inibição farmacológica do receptor de andrógeno por FLU, o qual foi responsável por acelerar o processo de reparo tecidual em camundongos (Ashcroft, Mills⁴, 2002). Todavia, uma vez que células HaCaT representam a linhagem de células epiteliais aneuplóides, associadas a alterações cromossômicas (Boukamp et al.¹¹, 1988), mais estudos devem ser conduzidos com a finalidade de se avaliar a ação de andrógenos, de inibidores não-esteroidais da enzima aromatase e de inibidores não-esteroidais de receptores de hormônios sexuais sobre a capacidade de repovoamento de células epiteliais HaCaT em cultura celular.

7 CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais utilizadas neste estudo *in vitro*, foi possível concluir que:

1. De modo geral, hormônios esteroides androgênicos exercem efeitos opostos sobre eventos celulares de fibroblastos gengivais humano e células epiteliais HaCaT em cultura celular.
2. Embora as concentrações de DHT tenham diminuído a síntese de ácido hialurônico por fibroblastos gengivais, tanto a T quanto a DHT foram responsáveis por estimular a proliferação, metabolismo e o repovoamento dos fibroblastos *in vitro*. Em contrapartida, a exposição de células HaCaT a estes mesmos andrógenos resultou na inibição ou em efeitos exíguos, sobre o crescimento, atividade metabólica ou a capacidade de repovoamento celular da área de arranhão *in vitro*.
3. O tratamento com o inibidor não-esteroidal da enzima aromatase, com o antiandrógeno e antiestrógeno, respectivamente, ANA, FLU e FUL, exerceram efeitos isolados ou em associação à T, influenciando eventos celulares de fibroblastos gengivais humano e células epiteliais HaCaT *in vitro*.

REFERÊNCIAS*

1. Aggarwal S, Thareja S, Verma A, Bhardwaj T, Kumar M. An overview on 5 α -reductase inhibitors. *Steroids*. 2010; 75(2): 109-53.
2. Almeida JP, Coletta RD, Silva SD, Agostini M, Vargas PA, Bozzo L, et al. Proliferation of fibroblasts cultured from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis is dependent on fatty acid synthase activity. *J Periodontol*. 2005; 76(2): 272-8.
3. Altenburger R, Kissel T. The human keratinocyte cell line HaCaT: an in vitro cell culture model for keratinocyte testosterone metabolism. *Pharm Res*. 1999; 16(5): 766-71.
4. Ashcroft GS, Mills SJ. Androgen receptor-mediated inhibition of cutaneous wound healing. *J Clin Invest*. 2002; 110(5): 615-24.
5. Ashcroft GS, Mills SJ, Lei K, Gibbons L, Jeong M-JJ, Taniguchi M, et al. Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *J Clin Invest*. 2003; 111(9): 1309-18.
6. Basso FG, Pansani TN, Turrioni AS, Bagnato VS, Hebling J, de Costa CA. In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. *Int J Dent*. 2012; 2012:719452.
7. Bezerra J, de Siqueira A, Pires A, Marques M, Duarte P, Bastos M. Effects of estrogen deficiency and/or caffeine intake on alveolar bone loss, density and healing: a study in rats. *J Periodontol*. 2013; 84(6): 839-49.
8. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, et al. Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95(6): 2536-59.
9. Blasco-Baque V, Serino M, Vergnes J-NN, Riant E, Loubieres P, Arnal J-FF, et al. High-fat diet induces periodontitis in mice through lipopolysaccharides (LPS) receptor signaling: protective action of estrogens. *PloS One*. 2012; 7(11): e48220.
10. Bläuer M, Vaalasti A, Pauli SL, Ylikomi T, Joensuu T, Tuohimaa P. Location of androgen receptor in human skin. *J Invest Dermatol*. 1991; 97(2): 264-8.

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptados das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

11. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 1988; 106(3): 761-71.
12. Castoria G, D'Amato L, Ciociola A, Giovannelli P, Giraldi T, Sepe L, et al. Androgen-induced cell migration: role of androgen receptor/filamin a association. *PLoS One.* 2011; 16;6(2): e17218.
13. Chen H, Xu X, Liu M, Zhang W, Ke H-z, Qin A, et al. Sclerostin antibody treatment causes greater alveolar crest height and bone mass in an ovariectomized rat model of localized periodontitis. *Bone.* 2015; 76: 141-8.
14. Chumsri S, Howes T, Bao T, Sabnis G, Brodie A. Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011; 125(1-2): 13-22.
15. Chung C-C, Hsu R-C, Kao Y-H, Liou J-P, Lu Y-Y, Chen Y-J. Androgen attenuates cardiac fibroblasts activations through modulations of transforming growth factor- β and angiotensin II signaling. *Int J Cardiol.* 2014; 176(2): 386-93.
16. Clark AS, Henderson LP. Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. *Neurosci Biobehav Rev.* 2003; 27(5): 413-36.
17. Coletta RD, Reynolds MA, Martelli-Junior H, Graner E, Almeida OP, Sauk JJ. Testosterone stimulates proliferation and inhibits interleukin-6 production of normal and hereditary gingival fibromatosis fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol.* 2002; 17(3): 186-92.
18. Cunningham M, Gilkeson G. Estrogen receptors in immunity and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2011; 40(1): 66-73.
19. Dai J, Ma Y, Shi M, Cao Z, Zhang Y, Miron RJ. Initial changes in alveolar bone volume for sham-operated and ovariectomized rats in ligature-induced experimental periodontitis. *Clin Oral Investig.* 2016; 20(3): 581-8.
20. Engeland CG, Sabzehei B, Marucha PT. Sex hormones and mucosal wound healing. *Brain Behav Immun.* 2008; 23(5): 629-35.
21. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82(12): 4258-65.

22. 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.
23. Gilliver SC, Ashworth JJ, Mills SJ, Hardman MJ, Ashcroft GS. Androgens modulate the inflammatory response during acute wound healing. *J Cell Sci*. 2006; 119(4): 722-32.
24. Gilliver SC, Ruckshanthi JPD, Hardman MJ, Zeef LAH, Ashcroft GS. 5 α -Dihydrotestosterone (DHT) retards wound closure by inhibiting re-epithelialization. *J Pathol*. 2009; 217(1): 73-82.
25. Gingras S, Turgeon C, Brochu N, Soucy P, Labrie F, Simard J. Characterization and modulation of sex steroid metabolizing activity in normal human keratinocytes in primary culture and HaCaT cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003; 87(2-3): 167-79.
26. Gornstein RA, Lapp CA, Bustos-Valdes SM, Zamorano P. Androgens modulate interleukin-6 production by gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol*. 1999; 70(6): 604-9.
27. Gruenewald DA, Naai MA, Marck BT, Matsumoto AM. Age-related decrease in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression, but not pituitary responsiveness to gnrh, in the male brown norway rat. *J Androl*. 2000; 21(1): 72-84.
28. Güncü GN, Tözüm TF, Çağlayan F. Effects of endogenous sex hormones on the periodontium — Review of literature. *Aust Dent J*. 2005; 50(3): 138-45.
29. Haas AN, Rösing CK, Oppermann RV, Albandar JM, Susin C. Association among menopause, hormone replacement therapy, and periodontal attachment loss in southern brazilian women. *J Periodontol*. 2009; 80(9): 1380-7.
30. Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol In Vitro*. 2004; 18(5): 703-10.
31. Harada N. A unique aromatase (P-450AROM) mRNA formed by alternative use of tissue-specific exons 1 in human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 189(2): 1001-7.

32. Hashikawa T, Takedachi M, Terakura M, Yamada S, Thompson LF, Shimabukuro Y, et al. Activation of adenosine receptor on gingival fibroblasts. *J Dent Res*. 2006; 85(8): 739-44.
33. Hoang AM, Oates TW, Cochran DL. In vitro wound healing responses to enamel matrix derivative. *J Periodontol*. 2000; 71(8): 1270-7.
34. Hong Y, Rashid R, Chen S. Binding features of steroidal and nonsteroidal inhibitors. *Steroids*. 2011; 76(8): 802-6.
35. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, et al. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science*. 1999; 283(5398): 83-7.
36. Jahan MR, Kokubu K, Islam MN, Matsuo C, Yanai A, Wroblewski G, et al. Species differences in androgen receptor expression in the medial preoptic and anterior hypothalamic areas of adult male and female rodents. *Neuroscience*. 2015; 284: 943-61.
37. Kanayama G, Hudson JI, Pope HG. Long-term psychiatric and medical consequences of anabolic-androgenic steroid abuse: a looming public health concern? *Drug Alcohol Depend*. 2008; 98(1-2): 1-12.
38. Keenan DM, Veldhuis JD. Divergent gonadotropin-gonadal dose-responsive coupling in healthy young and aging men. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 286(2): 9.
39. Lackler KP, Cochran DL, Hoang AM, Takacs V, Oates TW. Development of an in vitro wound healing model for periodontal cells. *J Periodontol*. 2000; 71(2): 226-37.
40. Lai J-J, Lai K-P, Chuang K-H, Chang P, Yu IC, Lin W-J, 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.
41. Lai J-JJ, Lai K-PP, Zeng W, Chuang K-HH, Altuwaijri S, Chang C. Androgen receptor influences on body defense system via modulation of innate and adaptive immune systems: lessons from conditional AR knockout mice. *Am J Pathol*. 2012; 181(5): 1504-12.
42. Li X, Chen C, Singh SM, Labire F. The enzyme and inhibitors of 4-ene-3-oxosteroid 5 α -oxidoreductase. *Steroids*. 1995; 60(6): 430-41.

43. Liang C-CC, Park AY, Guan J-LL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007; 2(2): 329-33.
44. Liang T, Hoyer S, Yu R, Soltani K, Lorincz AL, Hiipakka RA, et al. Immunocytochemical localization of androgen receptors in human skin using monoclonal antibodies against the androgen receptor. *J Invest Dermatol.* 1993; 100(5): 663-6.
45. Lin SJ, Lu HK, Lee HW, Chen YC, Li CL, Wang LF. Nitric oxide inhibits androgen receptor-mediated collagen production in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2012; 47(6): 701-10.
46. Liu PY, Swerdloff RS, Veldhuis JD. Clinical review 171: the rationale, efficacy and safety of androgen therapy in older men: future research and current practice recommendations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(10): 4789-96.
47. Mariotti A, Mawhinney M. Endocrinology of sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. *Periodontol 2000.* 2013; 61(1): 69-88.
48. Martelli-Junior H, Cotrim P, Graner E, Sauk JJ, Coletta RD. Effect of transforming growth factor-beta1, interleukin-6, and interferon-gamma on the expression of type I collagen, heat shock protein 47, matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-2 by fibroblasts from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis. *J Periodontol.* 2003; 74(3): 296-306.
49. Mascarenhas P, Gapski R, Al-Shammari K, Wang HL. Influence of sex hormones on the periodontium. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(8): 671-81.
50. Mawhinney M, Mariotti A. Physiology, pathology and pharmacology of the male reproductive system. *Periodontol 2000.* 2013; 61(1): 232-51.
51. Millar RP, Lu Z-L, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K, Maudsley SR. Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev.* 2004; 25(2): 235-75.
52. Mills SJ, Ashworth JJ, Gilliver SC, Hardman MJ, Ashcroft GS. The sex steroid precursor DHEA accelerates cutaneous wound healing via the estrogen receptors. *J Invest Dermatol.* 2005; 125(5): 1053-62.
53. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. *Endocr Rev.* 1987; 8(1): 1-28.

54. Mueller J, Garbers C, Ding Z, Schrader J, Scheller J, Fischer JW. Interleukin-6 promotes formation of provisional hyaluronan matrix post myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2013; 34(suppl 1): 776.
55. Mumford JH, Carnes DL, Cochran DL, Oates TW. The effects of platelet-derived growth factor-BB on periodontal cells in an in vitro wound model. *J Periodontol*. 2001; 72(3): 331-40.
56. Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2010; 31(3): 461-6.
57. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*. 2006; 40: 11-28.
58. Nawata H, Tanaka S, Tanaka S, Takayanagi R, Sakai Y, Yanase T, et al. Aromatase in bone cell: association with osteoporosis in postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995; 53(1-6): 165-74.
59. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000; 267(17): 5421-6.
60. Olsen B. New insights into the function of collagens from genetic analysis. *Curr Opin Cell Biol*. 1995; 7(5): 720-7.
61. Osborne CK, Wakeling A, Nicholson RI. Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *Br J Cancer*. 2004; 90 Suppl 1:S2-6.
62. Ozcelik O, Haytac MC, Seydaoglu G. The effects of anabolic androgenic steroid abuse on gingival tissues. *J Periodontol*. 2006; 77(7): 1104-9.
63. Pan HJ, Uno H, Inui S, Fulmer NO, Chang C. Roles of testosterone in the growth of keratinocytes through bald frontal dermal papilla cells. *Endocrine*. 1999; 11(3): 321-7.
64. Papadimitriou E, Lelkes PI. Measurement of cell numbers in microtiter culture plates using the fluorescent dye Hoechst 33258. *J Immunol Methods*. 1993; 162(1): 41-5.
65. Parkar M, Tabona P, Newman H, Olsen I. IL-6 expression by oral fibroblasts is regulated by androgen. *Cytokine*. 1998; 10(8): 613-9.

66. Pirilä E, Parikka M, Ramamurthy NS, Maisi P, McClain S, Kucine A, et al. Chemically modified tetracycline (CMT-8) and estrogen promote wound healing in ovariectomized rats: Effects on matrix metalloproteinase-2, membrane type 1 matrix metalloproteinase, and laminin-5 γ 2-chain. *Wound Repair Regen.* 2002; 10(1): 38-51.
67. Pomari E, Valle L, Pertile P, Colombo L, Thornton JM. Intracrine sex steroid synthesis and signaling in human epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts. *FASEB J.* 2015; 29(2): 508-24.
68. Reynolds MA, Aberdeen GW, Pepe GJ, Sauk JJ, Albrecht ED. Estrogen suppression induces papillary gingival overgrowth in pregnant baboons. *J Periodontol.* 2004; 75(5): 693-701.
69. Romana-Souza B, 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.
70. Santen RJ, Brodie H, Simpson ER, Siiteri PK, Brodie A. History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target. *Endocr Rev.* 2009; 30(4): 343-75.
71. Shiao HJ, Aichelmann-Reidy ME, Reynolds MA. Influence of sex steroids on inflammation and bone metabolism. *Periodontol 2000.* 2014; 64(1): 81-94.
72. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem.* 2009; 78: 929-58.
73. Simpson ER. Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003; 86(3-5): 225-30.
74. Sinnesael M, Boonen S, Claessens F, Gielen E, Vanderschueren D. Testosterone and the male skeleton: a dual mode of action. *J Osteoporos.* 2011; 2011: 240328.
75. Soory M, Ahmad S. 5α -reductase activity in human gingiva and gingival fibroblasts in response to bacterial culture supernatants, using [14C]4-androstenedione as substrate. *Arch Oral Biol.* 1997; 42(4): 255-62.
76. Soory M, Viridi H. Effects of the anti-androgen finasteride on 5α -reductase activity in human gingival fibroblasts in response to minocycline. *J Clin Periodontol.* 1998; 25(1): 67-73.

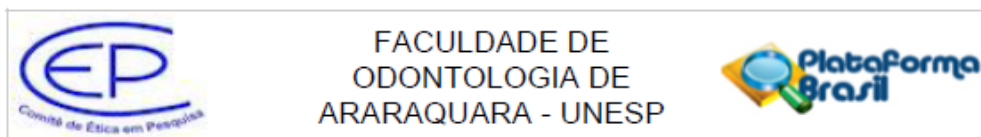
77. Steffens J, Coimbra L, Rossa C, Kantarci A, Dyke TE, Spolidorio L. Androgen receptors and experimental bone loss – an in vivo and in vitro study. *Bone*. 2015; 81: 683-90.
78. Steffens JP, Coimbra LS, Ramalho-Lucas PD, Rossa C, Spolidorio LC. The effect of supra- and subphysiologic testosterone levels on ligature-induced bone loss in rats — a radiographic and histologic pilot study. *J Periodontol*. 2012; 83(11): 1432-9.
79. Steffens JP, Herrera BS, Coimbra LS, Stephens DN, Rossa C, Spolidorio LC, et al. Testosterone regulates bone response to inflammation. *Horm Metab Res*. 2014; 46(3): 193-200.
80. Stevenson S, Sharpe DT, Thornton JM. Effects of oestrogen agonists on human dermal fibroblasts in an in vitro wounding assay. *Exp Dermatol*. 2009; 18(11): 988-90.
81. Tajima S, Pinnell SR. Collagen synthesis by human skin fibroblasts in culture: studies of fibroblasts explanted from papillary and reticular dermis. *J Invest Dermatol*. 1981; 77(5): 410-2.
82. Takahashi N, Kobayashi M, Takaki T, Takano K, Miyata M, Okamatsu Y, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide stimulates collagen phagocytosis by human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23(3): 259-64.
83. Takuwa Y, Ohse C, Wang EA, Wozney JM, Yamashita K. Bone morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 174(1): 96-101.
84. Tan EM, Qin H, Kennedy SH, Rouda S, Fox JW, Moore JH. Platelet-derived growth factors-AA and -BB regulate collagen and collagenase gene expression differentially in human fibroblasts. *Biochem J*. 1995; 310 (Pt 2): 585-8.
85. Tan EMH, Li J, Xu EH, Melcher K, Yong E-l. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*. 2015; 36(1): 3-23.
86. Tanriverdi F, Silveira LFG, MacColl GS, Bouloux PMG. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. *J Endocrinol*. 2003; 176(3): 293-304.
87. Tilakaratne A, Soory M. Androgen metabolism in response to oestradiol-17b and progesterone in human gingival fibroblasts (HGF) in culture. *J Clin Periodontol*. 1999; 26(11): 723-31.

88. Tilakaratne A, Soory M, Ranasinghe AW, Corea SMX, Ekanayake SL, Silva M. Periodontal disease status during pregnancy and 3 months post-partum, in a rural population of Sri-Lankan women. *J Clin Periodontol*. 2000; 27(10): 787-92.
89. Toraldo G, Bhasin S, Bakhit M, Guo W, Serra C, Safer JD, et al. Topical androgen antagonism promotes cutaneous wound healing without systemic androgen deprivation by blocking β -catenin nuclear translocation and cross-talk with TGF- β signaling in keratinocytes. *Wound Repair Regen*. 2012; 20(1): 61-73.
90. Ubuka T, Son Y, Bentley GE, Millar RP, Tsutsui K. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH), GnIH receptor and cell signaling. *Gen Comp Endocrinol*. 2013; 190: 10-7.
91. Van Amsterdam J, Opperhuizen A, Hartgens F. Adverse health effects of anabolic-androgenic steroids. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2010; 57(1): 117-23.
92. Veldhuis JD. Aging and hormones of the hypothalamo-pituitary axis: gonadotropic axis in men and somatotrophic axes in men and women. *Ageing Res Rev*. 2008; 7(3): 189-208.
93. Veldhuis JD. Recent insights into neuroendocrine mechanisms of aging of the human male hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Androl*. 1999; 20(1): 1-17.
94. Wang Q, Kessler MJ, Kensler TB, Dechow PC. The mandibles of castrated male rhesus macaques (*Macaca mulatta*): The effects of orchidectomy on bone and teeth. *Am J Phys Anthropol*. 2016; 159(1): 31-51.
95. Welder AA, Robertson JW, Melchert RB. Toxic effects of anabolic-androgenic steroids in primary rat hepatic cell cultures. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1995; 33(4): 187-95.
96. Wilson CM, McPhaul MJ. A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. *Mol Cell Endocrinol*. 1996; 120(1): 51-7.
97. Yang C, Li Q, Li Y. Targeting nuclear receptors with marine natural products. *Mar Drugs*. 2014; 12(2): 601-35.
98. Yeap BB. Testosterone and ill-health in aging men. *Nat Clin Prac Endocrinol Metab*. 2009; 5(2): 113-21.
99. Zhang G, Li J, Purkayastha S, Tang Y, Zhang H, Yin Y, et al. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- β , NF- κ B and GnRH. *Nature*. 2013; 497(7448): 211-6.

100. Zhang X, Kiechle FL. Hoechst 33342 induces apoptosis and alters tata box binding protein/dna complexes in nuclei from bc3h-1 myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 248(1): 18-21.
101. Zitzmann M, Faber S, Nieschlag E. Association of specific symptoms and metabolic risks with serum testosterone in older men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(11): 4335-43.

ANEXO A

Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FOAr/UNESP.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Impacto de andrógenos sobre a proliferação e atividade de fibroblastos e células epiteliais in vitro

Pesquisador: Luís Carlos Spolidorio

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 48882715.4.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA EDUCACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.349.165

Apresentação do Projeto:

Projeto bem detalhado no qual busca avaliar como os andrógenos atuam sobre o metabolismo de fibroblastos e queratinócitos.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do estudo é de avaliar o metabolismo, proliferação e migração celular, determinados como indicativos da capacidade de reparo de fibroblastos e queratinócitos sob o efeito da administração farmacológica de andrógenos. Como objetivos secundários os autores apresentam ainda a Avaliação da influência da testosterona e inibidores farmacológicos de receptores de andrógenos sobre a capacidade de reparo de fibroblastos gengivais e queratinócitos in vitro.

Avaliação do efeito do andrógeno não-aromatizável (DHT) sobre a capacidade de reparo de fibroblastos gengivais e queratinócitos in vitro.

Avaliação da influência da testosterona e inibidores farmacológicos de receptores de estrógenos sobre o processo de reparo in vitro.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos apresentados são:

- " Os mesmos decorrentes da cirurgia: dor, sangramento, inflamação, inchaço, dificuldade para abrir a boca, infecção. Os riscos serão controlados com medicamentos prescritos conforme a

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 1.349.165

orientação do profissional responsável pela Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara. A retirada da papila gengival pode determinar aumento no tempo de cirurgia, não havendo riscos extra como a necessidade de utilização de outras drogas ou maiores doses de anestesia, a não ser as necessárias para a exodontia indicadas pelo cirurgião-dentista responsável pela cirurgia." (estas informações foram todas apresentadas no TCLE).

Os benefícios apresentados são relacionados com os conhecimentos científicos decorrentes dos resultados, portanto, não haverá benefício direto para os participantes da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta relevância para a ciência, sendo estes benefícios justificáveis frente aos riscos apresentados aos sujeitos da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentadas: Declaração de cumprimento das normas da Resolução 466/12 do CNS e Autorização para uso da clínica de cirurgia do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da FOAr.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O resumo foi corrigido contendo agora a metodologia da pesquisa com a informação de que os queratinócitos de linhagem e fibroblastos isolados serão obtidos a partir de amostras da papila gengival obtidas de pacientes entre 18-25 anos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Atendidas pendências de reunião, considero APROVADO o protocolo.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_574576.pdf	23/11/2015 14:43:20		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_CEP.pdf	23/11/2015 14:41:02	Luís Carlos Spolidorio	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE.pdf	23/09/2015 19:31:50	Luís Carlos Spolidorio	Aceito

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 1.349.165

Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	23/09/2015 19:31:50	Luís Carlos Spolidorio	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Cumprimento_Normas.pdf	27/08/2015 11:54:39	Luís Carlos Spolidorio	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	21/08/2015 15:56:06	Luís Carlos Spolidorio	Aceito
Outros	Carta_Clinica.pdf	20/08/2015 13:34:36	Luís Carlos Spolidorio	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 03 de Dezembro de 2015

Assinado por:

Ligia Antunes Pereira Pinelli
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 21 de março de 2016.

LUÍS CARLOS LEAL SANTANA