

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 21/03/2018.



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.

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 gn rh, 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.