



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Odontologia

CLAUDIO GIRELLI JUNIOR

**“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DEFICÊNCIA DE
TESTOSTERONA SOBRE OS TECIDOS PERIODONTAIS DE
RATOS CASTRADOS E COM PERIODONTITE EXPERIMENTAL”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Manoela Porto Amorim
Coorientador: Prof.Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa

CASCADEL-PR
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G436a Girelli Junior, Claudio
"Avaliação dos efeitos da deficiência de testosterona sobre os tecidos periodontais de ratos castrados e com periodontite experimental". / Claudio Girelli Junior. Cascavel, PR: UNIOESTE, 2015.
59 p.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elaine Manoela Porto Amorim
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Odontologia

1.Odontologia. 2. Doença periodontal. 3. Deficiência de testosterona. 4. Castração. 5. Tecidos periodontais. 6. Ratos Wistar. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 21.ed. 617.632

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio CRB-9^a/965



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Odontologia



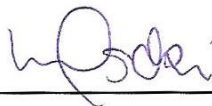
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública, realizada em 24 de fevereiro de 2015, considerou o candidato Claudio Girelli Junior aprovado.



Prof.^a Dr.^a Elaine Manoela Porto



Prof. Dr. João Paulo de Arruda Amorim



Prof.^a Dr.^a Lucila Piasecki

Dedico este trabalho aos meus pais
Cláudio Girelli e Maria Salete dos
Santos Girell, minha esposa Patrícia
e meus filhos Pedro Antônio e
Bernardo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus passos, por me dar força e inteligência em momentos difíceis que passei.

Aos professores Prof. Dr. Carlos Augusto Nassar e Profa. Dra. Patrícia Oehlmeyer Nassar, pelos incentivos que me concederam de maneira direta durante a graduação para executar um projeto de pesquisa, além do incentivo para o ingresso no mestrado.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Luiz Gustavo de A. Chuffa, pela sua paciência e ensinamentos durante minha estadia na UNESP de Botucatu-SP, e ao Prof. Dr. João Paulo de A. Amorim que colaborou durante a fase laboratorial.

Ao programa de Pós-graduação em Odontologia pela oportunidade de realizar o mestrado.

A secretária Zeli Becker da Luz, excelente pessoa e profissional extremamente dedicada ao programa e aos alunos. Muito obrigado.

A CAPES e a Fundação Araucária, pela concessão da bolsa, sem a qual eu não poderia realizar esse trabalho.

Aos demais professores do Programa de Pós Graduação em Odontologia, pelos ensinamentos e aulas ministradas.

Aos colegas de curso, que foram meus professores e tornaram-se colegas de aula Adriano Piccolotto, Marçal Seitaro Matusmoto, aos que realizaram a pesquisa na linha de patologia Karine Figueredo da Costa, Lúcio Paulo de Godoy Chicarrelli, Paula Bernardo, Renata Zoraide Rizental Delgado e aos demais, pelos exemplos, dificuldades superadas e bons momentos compartilhados.

A todos os funcionários da Unioeste, o meu sincero agradecimento, em especial a técnica Vera Lúcia C. *Dal'osto*, pela colaboração direta nas rotinas de laboratório.

Agradeço em especial a minha orientadora Profa. Dra. Elaine Manoela Porto Amorim, exemplo de dedicação que guiou os passos desta obra e minha formação. Muito obrigado.

EQUIPE EXECUTORA

Orientadora

Elaine Manoela Porto Amorim. Doutora em Biologia Celular e Estrutural, pela Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Professora adjunta e docente efetivo do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE – Campus de Cascavel-PR.

Coorientador

Luiz Gustavo de Almeida Chuffa. Doutor em Biologia Celular e Estrutural, pela Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Professor Assistente Doutor do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências do de Botucatu. Universidade Estadual Paulista - UNESP – Campus de Botucatu-SP.

Mestrando

Claudio Girelli Junior. Especialista em Cirurgia Buco-Maxilo-Facial pela Associação Brasileira de Odontologia da Regional Ponta de Grossa-PR. Bolsista Capes/Fundação Araucária. Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Odontologia – UNIOESTE – Campus de Cascavel-PR.

Colaboradores

Sâmela Alves Gonçalves. Bolsista PIBIC/CNPq - Unioeste (período 2013-2014). Acadêmica do 4º ano do Curso de Ciências Biológicas - UNIOESTE - Campus de Cascavel-PR.

Romário Willian Welter. Bolsista PIBIC/CNPq – Unioeste (período 2013-2014). Acadêmico do 2º ano do Curso de Odontologia – UNIOESTE - Campus de Cascavel-PR.

LOCAIS DE REALIZAÇÃO

Biotério Setorial do laboratório de Fisiologia, localizado no 3º piso do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – (CCBS), da Unioeste, Campus de Cascavel-PR.

Laboratório de Histologia, localizado no 2º piso do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – (CCBS), da Unioeste, Campus de Cascavel-PR.

Laboratório de Histopatologia, localizado no prédio do Curso de Odontologia da Unioeste, Campus de Cascavel-PR.

Laboratório de Pesquisa do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP, Campus de Botucatu-SP.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

T: Testosterona

DP: doença periodontal

LP: Ligamento Periodontal

SHGB: Globulina Ligadora de Hormônio Sexual

CON: Grupo controle sem ligadura

CON+LIG: Grupo controle com ligadura

CAST: Grupo castrado sem ligadura

CAST+LIG: Grupo castrado com ligadura

AR: Receptor de Andrógeno

Er α : Receptor de Estrógeno (isoforma alfa)

Er β : Receptor de Estrógeno (isoforma beta)

HPG: Eixo Hipotalâmico-hipofisário-gonadal

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofina

FSH: hormônio folículo estimulante

LH: Hormônio Luteinizante

SUMÁRIO

1) Resumo.....	10
2) Abstract.....	12
3) Introdução.....	14
3.1. Justificativa e relevancia do tema.....	15
4) Revisão Bibliográfica.....	17
4.1 Periodonto Marginal ou de Proteção.....	18
4.2 Periodonto de Inserção ou Sustentação.....	19
4.2.1 Cimento.....	20
4.2.2 Ligamento periodontal.....	21
4.2.3 Osso alveolar.....	22
4.3 Testosterona.....	23
4.4 Testosterona e Doença Periodontal.....	26
5) Objetivos.....	29
5.1 Gerais.....	30
5.2 Específicos.....	30
6) Materiais e Métodos.....	31
6.1 Animais.....	32
6.2 Grupos experimentais.....	32
6.3 Coleta e processamento do material.....	33
6.4 Avaliação Radiográfica.....	34
6.5 Análise histomorfométrica.....	34
6.6 Análise Estatística.....	35
7) Resultados.....	36
8) Discussão.....	42
9) Conclusões.....	48
10) Referências bibliográficas.....	50
11) Anexos.....	59

1. RESUMO

A testosterona é o principal hormônio sexual esteróide masculino envolvido na diferenciação, desenvolvimento sexual e controle das funções reprodutivas masculina. Além do seu papel na endocrinologia reprodutiva e fertilidade, a testosterona é um hormônio importante na regulação e funcionamento de outros órgãos e tecidos corporais tais como o rim, coração, músculo estriado esquelético, sistema imunológico e os tecidos orais e periodontais. A periodontite é uma doença caracterizada pelo processo inflamatório dos tecidos periodontais e juntamente com a cárie, são as grandes responsáveis pela perda de elementos dentais. As relações entre os hormônios sexuais esteróides e doença periodontal tem sido intensamente investigado em fêmeas, entretanto os estudos em machos ainda são escassos. Assim, o presente trabalho teve por objetivos analisar a influência da deficiência de testosterona sobre a perda óssea alveolar e estrutura histológica dos tecidos periodontais de ratos castrados e com periodontite experimental. Foram utilizados 28 ratos machos *Wistar*, fornecidos pelo Biotério Central da Unioeste. Aos 80 dias de idade os animais foram separados em quatro grupos experimentais, com 7 animais por grupo: controle sem ligadura (CON), Controle com ligadura (CON+LIG), castrado sem ligadura (CAST) e castrado com ligadura (CAST+LIG). Aos 90 dias de idade realizou-se a orquidectomia nos devidos grupos. Sessenta dias após a castração a doença periodontal foi induzida através da técnica de ligadura. Ao final do período experimental (90 dias após a castração), os animais foram pesados e sacrificados em câmara de CO₂. As mandíbulas foram retiradas, dissecadas, separadas em direita e esquerda, fixada em formalina tamponada a 10% por 24 horas, descalcificada e

processadas para técnicas histológicas e radiológicas. Os resultados do presente trabalho demonstraram que o modelo de ligadura foi eficiente em induzir a periodontite nos animais. O perfil de consumo alimentar foi semelhante entre os grupos. Os animais dos grupos CAST e CAST+LIG apresentaram significativa redução do peso corporal ao final do período experimental, quando comparados aos grupos CON e CON+LIG. A castração levou a uma significativa perda óssea nos animais, a qual foi acentuada com a indução da doença periodontal. Os animais com doença periodontal apresentaram aumento de área do epitélio gengival e área de tecido conjuntivo, quando comparado aos animais sem a doença. Concluímos que a testosterona é um importante regulador fisiológico do metabolismo ósseo alveolar. A deficiência de testosterona em sinergismo com a doença periodontal aumenta a reabsorção óssea alveolar e altera a espessura do epitélio gengival.

PALAVRAS CHAVE: Doença periodontal, Deficiência de testosterona, Castração, Tecidos periodontais, Ratos *Wistar*.

2. ABSTRACT

Testosterone is the principal male sex steroid hormone involved in differentiation, sexual development and control of male reproductive functions. In addition to its role in reproductive endocrinology and fertility, testosterone is an important hormone in the regulation and functioning of other organs and tissues including the kidney, heart, skeletal muscle, immune system and oral and periodontal tissues. Periodontitis is a disease characterized by inflammation of the periodontal tissues and associated with dental decay, are mainly responsible for the loss of dental elements. The relationship between sex steroids hormones and periodontal disease has been intensively investigated in females, however studies in males are still scarce. Therefore, the aim of the present project is to analyze the influence of testosterone deficiency on bone loss and histological structure of the periodontal tissues of castrated rats and experimental periodontitis. Twenty-eight male Wistar rats, provided by the Central Biotherium of Unioeste were used. At 80 days of age the animals were separated in four experimental groups, with 7 animals per group: no ligature control (CON), ligature control CON + LIG), no ligature castrated (CAST) and ligature castrated (CAST + LIG). At 90 days of age was held orchietomy in appropriate groups. Sixty days after castration, the periodontal disease was induced by ligature technique. At the end of experimental period (90 days after castration), the animals were weighed and euthanized in a CO₂ chamber. The mandible was removed, dissected, separated into left and right, were fixed by immersion in 10% buffered formalin for 24 hours, decalcified and processed for histological and radiological techniques. The results of this study showed that ligature model was effective

in inducing periodontitis in the animals. The food intake profile was similar between groups. The animals of CAST and CAST + LIG groups showed significant reduction in body weight at the end of experimental period, when compared with the groups CON and CON + LIG. Castration resulted in a significant bone loss in animals, which was accentuated with the induction of periodontal disease. Animals with periodontal diseases presented increased of gingival epithelium and connective tissue area, compared to animals without the disease. We conclude that testosterone is a physiological regulator important of alveolar bone metabolism. Testosterone deficiency in synergism with periodontal disease increases alveolar bone resorption and alters the thickness of gingival epithelium.

Key words: Periodontal disease, Testosterone, Castration, Periodontal tissues, *Wistar* rats.

Introdução

3. INTRODUÇÃO

3.1. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA

A testosterona (T) é o principal androgênio circulante nos homens, sendo produzida e secretada, na sua maior parte (cerca de 95%), pelas células de Leydig nos testículos. A função primária da testosterona no organismo masculino está relacionada ao desenvolvimento e manutenção dos órgãos reprodutivos e das características sexuais secundárias, no controle das funções reprodutivas e da fertilidade. Além do seu papel na endocrinologia reprodutiva, a T é um hormônio importante na regulação e funcionamento de outros órgãos e tecidos corporais tais como o rim, coração, músculo estriado esquelético, sistema imunológico, glândulas salivares, tecido ósseo, tecidos orais e periodontais (Mooradian, *et al.*, 1987; Mariotti, 1994; Mariotti & Mawhinney, 2013).

É bem estabelecido na literatura científica que as concentrações de testosterona nos homens diminui com o avanço da idade (Haring *et al.*, 2010) Especificamente, a partir dos 40 anos de idade ocorre, em média, uma diminuição de 1-2% das concentrações de testosterona total (Zirkin & Tenover, 2012). Aos 75 anos, a concentração plasmática do hormônio corresponde a aproximadamente dois terços da concentração de testosterona aos 25 anos de idade (Kaufman & Vermeulen, 2005).

Estudos tanto em humanos quanto em animais experimentais tem demonstrado que a diminuição das concentrações de testosterona é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Svartberg *et al.*, 2004), inflamação (Haring *et al.*, 2012), dislipidemia (Haring *et al.*, 2011), hipertensão (Torkler *et al.*, 2011), síndrome metabólica (Choudhury *et al.*,

2013), diabetes tipo 2 (Schipf *et al.*, 2011), osteoporose (Wang *et al.*, 2013) e doença periodontal (Daltaban *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2011).

A doença periodontal (DP) ou periodontite, é uma doença inflamatória crônica, infecciosa que afeta o periodonto (Di Benetto *et al.*, 2013) e juntamente com a carie, são as grandes responsáveis pela perda de elementos dentais (Montandon *et al.*, 2012).

Estudos demonstram que a diminuição nas concentrações de testosterona nos homens está relacionada com alterações no osso alveolar, como o aumento da porosidade alveolar, alteração no padrão trabecular, reabsorção óssea alveolar, diminuição da densidade mineral óssea na maxila e mandíbula e aumento na secreção de interleucinas (IL-1 IL-6) (Sooriyamoorthy & Gower, 1989; Samelson *et al.*, 2006; Kuo *et al.*, 2008). Na presença da periodontite crônica, estas alterações são mais acentuadas e podem levar a perda dentária (Singh *et al.*, 2011). Em animais experimentais, Steffens *et al.*, (2012) demonstraram que a queda nas concentrações de testosterona, em decorrência da orquidectomia bilateral, associada à doença periodontal induzida por ligadura, aumentou significativamente a perda óssea nos animais.

Estas observações sugerem que os tecidos periodontais são alvos da ação dos androgênios e estes hormônios são importantes fatores na patogênese das doenças periodontais. Além disso, as doenças periodontais podem ser uma consequência das ações e interações de hormônios esteróides sexuais sobre células específicas encontradas no periodonto. Entretanto, esta relação tem sido pouco explorada em homens e seus mecanismos são pouco conhecidos.

Revisão Bibliográfica

4. REVISÃO BIBLIGRÁFICA

O periodonto é constituído pelas estruturas que participam da proteção e sustentação dos dentes na maxila e na mandíbula e pode ser dividido em duas regiões: 1) periodonto marginal ou de proteção, constituído pela gengiva, que recobre a crista do processo alveolar e estabelece continuidade do epitélio da mucosa oral com o colo do dente pelo epitélio juncional, e 2) periodonto de sustentação ou inserção, constituído pelo cimento, ligamento periodontal e processo ósseo alveolar, responsáveis pela ancoragem do dente no alvéolo (Lindhe *et al.*, 1999; Di Benedetto *et al.*, 2013).

4.1. Periodonto marginal ou de proteção

A gengiva é a parte da mucosa oral mastigatória que reveste os processos alveolares e rodeia o colo dos dentes aos quais se adere através da junção dentogengival (Ferraris & Muñoz, 2006).

Clinicamente a gengiva é dividida em três regiões: gengiva livre ou marginal, inserida e papilar ou interdentária que determina o periodonto de proteção. Histologicamente a gengiva é caracterizada por um epitélio estratificado pavimentoso, cuja espessura do epitélio depende do grau de queratinização, no qual distingue-se as seguintes camadas de células epiteliais: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo (Katchburian & Arana, 2012).

O epitélio gengival está apoiado em uma lâmina própria de tecido conjuntivo que varia de frouxo a denso, constituído por uma variedade de

células (fibroblastos, macrófagos e linfócitos) e uma matriz extracelular rica em colágeno I (Katchburian & Arana, 2012; Ferraris & Muñoz, 2006).

A junção dentogengival é constituída pelo epitélio do sulco, que reveste o sulco gengival e o epitélio juncional, também denominado epitélio de fixação, o qual apresenta uma alta taxa da renovação celular (Nanci & Bosshardt, 2006). Ambas as regiões são constituídas por um epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado apoiado em uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo, com uma extensa rede vascular. Nesta região é normalmente visualizado um infiltrado inflamatório, constituído por vários tipos celulares (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) que desempenham um papel fundamental em processos fisiológicos e patológicos no tecido (Ferraris *et al.*, 2006)

4.2. Periodonto de inserção ou sustentação

O cemento, o ligamento periodontal e o processo ósseo alveolar constituem uma unidade estrutural e funcional denominado periodonto de inserção ou sustentação, entre o dente e o alvéolo dentário. Estas estruturas possuem origem ectomesenquimal, a partir da diferenciação das células do saco ou folículo dentário. Sua função é fixar os dentes nos ossos da maxila e mandíbula. Além disso, funcionam como um sistema para amortecimento das forças mastigatórias para evitar a fratura dos tecidos mineralizados do dente (Katchburian & Arana, 2012).

4.2.1. Cimento

O cimento é um tecido conjuntivo mineralizado, avascular, que recobre a dentina radicular, tendo como principal função a inserção das fibras do ligamento periodontal na raiz do dente. É constituído por 60% de mineral (principalmente cristais de hidroxiapatita) e 40% de matriz orgânica, constituída majoritariamente por colágeno do tipo I. A espessura do cimento é variável sendo mais fino no terço cervical da raiz, aumentando gradualmente em direção apical (Katchburian & Arana, 2012).

Estruturalmente pode ser dividido em: cimento acelular de fibras extrínsecas, encontrado na porção cervical de todos os dentes e cimento celular, de fibras mistas (extrínsecas e intrínsecas), que recobre a porção apical da raiz, sendo caracterizado pela presença de células (cementócitos) em lacunas no interior da matriz (Foster, 2012). Acredita-se que a principal função do cimento celular esteja relacionada com movimentação dental pós-eruptiva e adaptação à oclusão (Foster, 2012), atuando também em processos de reparo em regiões de fratura ou reabsorção radicular (Nanci & Bosshardt, 2006). Por outro lado, o cimento acelular exerce um papel crítico na fixação das fibras do ligamento periodontal. Estudo demonstra que falhas no processo de cementogênese acelular estão relacionadas à uma fraca inserção das fibras colágenas do ligamento periodontal no cimento, podendo levar ao desenvolvimento da doença periodontal (Foster *et al.*, 2013).

4.2.2. Ligamento periodontal

O ligamento periodontal (LP) é um tecido conjuntivo frouxo, caracterizado por grossos feixes de colágeno que se inserem no cemento e no processo ósseo alveolar, estabelecendo desta maneira, a articulação entre o dente e seu alvéolo. É constituído por uma heterogênea população celular que incluem fibroblastos, que são responsáveis pela remodelação e renovação (*turnover*) dos componentes da matriz extracelular, osteoblastos, osteoclastos, restos de células epiteliais de Malassez, monócitos, macrófagos, células mesenquimais indiferenciadas, cementoblastos e odontoclastos (Cho & Garant, 2000).

A região preenchida pelo LP é conhecida como espaço periodontal. A espessura do ligamento periodontal varia de acordo com a região ao longo da raiz do dente e a idade, apresentando uma diminuição com o envelhecimento (Katchburian & Arana, 2012). O ligamento periodontal forma-se à medida que o dente se desenvolve e irrompe na cavidade oral, e sua estrutura não se completa até que o dente entre em oclusão e seja aplicada a força funcional (Ten Cate, 2001).

A principal função do LP é amortecer as forças mastigatórias e por meios de seus receptores sensoriais e proprioceptivos, desempenha importante papel na acomodação dos arcos dentários durante os movimentos funcionais mastigatórios do sistema estomatognático. Além disso, devido à presença de células indiferenciadas, o LP tem uma participação importante na homeostasia, regeneração e reparo dos tecidos periodontais (Xiau & Nasu, 2014).

4.2.3. Osso alveolar

O osso alveolar é a porção de tecido ósseo da maxila e da mandíbula que delimita o alvéolo dentário no qual o dente está alojado e fixado por meio das fibras do ligamento periodontal. Desta forma constitui uma verdadeira articulação que permite resistir as forças geradas pelo contato intermitente dos elementos dentários durante a mastigação, fonação e deglutição. É um tecido conjuntivo mineralizado constituído por 60% de substâncias minerais (principalmente cristais de hidroxiapatita), 20% de matriz orgânica, caracterizada principalmente por colágeno I e 20% de água (Ferraris & Munhoz, 2006).

A estrutura óssea é formada, mantida e remodelada pela ação de três células principais: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Essas células estão presentes na superfície das trabéculas ósseas do osso esponjoso, superfícies externa e interna do osso cortical e inseridos no próprio osso. Os osteoblastos produzem a matriz orgânica (osteóide) que sofre posterior calcificação. Durante o processo de maturação e calcificação do osteóide, alguns osteoblastos são aprisionados transformando-se em osteócitos. Os osteócitos alojados nas lacunas do osso calcificado ligam-se entre si e com osteoblastos da superfície óssea por meio de prolongamentos citoplasmáticos que estão presentes em canalículos. Já os osteoclastos estão nas superfícies ósseas e são responsáveis pela degradação da matriz óssea (Junqueira & Carneiro, 2004).

De uma maneira geral, os mecanismos reguladores de formação, remodelação e reabsorção óssea alveolar são os mesmos que controlam o tecido ósseo do restante do organismo. Entretanto, destaca-se que no osso

alveolar o *turnover* ocorre muito mais rapidamente e o tecido é totalmente reabsorvido na ausência do dente (Ferraris & Munhoz, 2006).

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

4.3. TESTOSTERONA

A testosterona (T) é o principal androgênio circulante nos homens, sendo produzida e secretada, na sua maior parte (aproximadamente 95%), pelas células de Leydig nos testículos e, em menor quantidade, pelas glândulas adrenais, que contribuem com menos de 5% da produção de T. Estima-se que apenas 2 a 3% da T circulante encontra-se disponível em sua forma livre, sendo que o restante encontra-se ligado a proteínas séricas como a Globulina Ligadora de Hormônio Sexual (SHBG), a albumina e a globulina de ligação com corticosteróide (Kaufman & Vermeulen, 2005). Entre as três proteínas, a SHBG possui a maior afinidade pela testosterona. A testosterona livre e a não ligada à SHBG representam as frações prontamente disponíveis para a ação biológica nos tecidos-alvo, também denominadas "testosterona biodisponível" (Pardridge, 1986).

A regulação da produção de T em homens eugonadais depende do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HPG). O hipotálamo secreta o hormônio

liberador de gonadotrofinas (GnRH), que age sobre a hipófise anterior estimulando-a a produzir o hormônio folículo-estimulante (FSH), que atua sobre as células de Sertoli, localizadas no interior dos túbulos seminíferos, e o hormônio luteinizante (LH), que atua sobre as células intersticiais de Leydig dos testículos, estimulando-as a produzirem a T (Bagatell & Bremner, 1996; Costanzo, 2006). O eixo HPG é regulado por um mecanismo de feedback negativo onde a T inibe a frequência e amplitude da liberação de GnRH a partir do hipotálamo, e também a secreção de LH pela hipófise (Dandona & Rosenberg, 2010).

A função da T, juntamente com a programação genética do indivíduo, no organismo masculino se inicia durante a gestação e está relacionada no desenvolvimento dos órgãos reprodutores, após esse período ela cessa, e ira atuar na puberdade de forma mais exacerbada, realizando o termino do desenvolvimento e manutenção dos órgãos reprodutivos e das características sexuais secundárias, principalmente no tecido ósseo, produzindo ossos mais longos e com maior proporção de massa cortical óssea, quando comparado com mulheres, além de atuar no tecido muscular também, produzindo característica resultante no dimorfismo sexual, além do controle das funções reprodutivas e da fertilidade (Vanderschueren *et al.*, 2004).

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

A ação androgênica da T nos diferentes órgãos-alvos ocorre por três vias principais: 1) diretamente através da ligação do hormônio aos receptores de andrógenos (AR), como ocorre no músculo; 2) após 5 α -redução da T à diidrotestosterona (DHT), pela ação da enzima 5- α -redutase, como ocorre na próstata e, 3) através da aromatização da T para estradiol, pela ação da enzima aromatase nos tecidos alvos, e da ligação do estradiol aos receptores de estrógeno (ERs), como ocorre por exemplo no tecido-ósseo (Mooradian *et al.*, 1987; Vanderschueren *et al.*, 2004).

É bem estabelecido na literatura científica que as concentrações de T nos homens diminui com a idade (Haring *et al.*, 2010; Zirkin & Tenover, 2012). Especificamente, a partir dos 40 anos ocorre, em média, uma diminuição de 1-2% das concentrações de testosterona total. Aos 75 anos, a concentração plasmática do hormônio corresponde a aproximadamente dois terços da concentração de testosterona aos 25 anos de idade (Kaufman & Vermeulen, 2005).

Clinicamente, a diminuição da produção e secreção de T é definida como hipogonadismo e está relacionada primariamente à disfunção da capacidade esteroidogênica das células de Leydig (Bassil & Morley, 2010; Tenover, 2003). Entretanto, além do envelhecimento, condições co-mórbidas como diabetes mellitus, obesidade, síndrome metabólica, hipertensão arterial e influências do estilo de vida (uso de álcool, tabaco e estresse psicológico) podem estar fortemente associados à diminuição de T no homem. Os principais sintomas associados ao hipogonadismo são diminuição da libido, disfunção erétil, diminuição da fertilidade, obesidade, alterações no humor, fadiga, depressão, diminuição da força e da massa muscular, diminuição da

densidade mineral óssea e prejuízo da qualidade de vida (Gooren, 2010; Wespes & Schulman, 2002).

Estudos em humanos e animais experimentais tem demonstrado que a diminuição das concentrações de testosterona é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Svartberg *et al.*, 2004), inflamação (Haring *et al.*, 2012), dislipidemia (Haring *et al.*, 2011), hipertensão (Torkler *et al.*, 2011), síndrome metabólica (Choudhury *et al.*, 2013), diabetes tipo 2 (Schipf *et al.*, 2011), osteoporose (Wang *et al.*, 2013) e doença periodontal (Daltaban *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2011).

4.4. TESTOSTERONA X DOENÇA PERIODONTAL

A gengivite e a doença periodontal (DP) ou periodontite são condições inflamatórias de natureza infecciosa frequentes na cavidade oral (Williams, 1990).

A gengivite é uma reação inflamatória reversível da gengiva marginal em resposta ao acúmulo de placa bacteriana, ao passo que a DP é uma doença inflamatória crônica, infecciosa, destrutiva, que acarreta a destruição dos tecidos de suporte dos dentes (Di Benetto *et al.*, 2013) e, juntamente com a cárie, são as grandes responsáveis pela perda de elementos dentais. Estudos demonstram que a cárie é a principal responsável pela perda de elementos dentais nas duas primeiras décadas de vida e, a partir da terceira década a causa dominante é a DP (Montandon *et al.*, 2012). Eke *et al.*, (2012), em levantamento epidemiológico realizado em 3.742 americanos, entre os anos de 2009 a 2010, revelou uma prevalência de periodontite em 47 % na população

de adultos com mais de 30 anos. Em adultos com idade entre 30 e 34 anos o índice foi de 24,4% e adultos com 65 anos o índice foi de 70,1%.

Page & Schroeder (1976), com base em critérios clínicos e histológicos, dividiram a doença periodontal em quatro fases: inicial, precoce, estabelecida e avançada. A fase inicial é caracterizada pela inflamação que se desenvolve em consequência do acúmulo de placa bacteriana no tecido gengival. Afeta a região do sulco gengival, epitélio juncional e a região mais coronária do tecido conjuntivo subjacente ao epitélio. Esta fase, é caracterizada pela dilatação dos vasos sanguíneos no tecido conjuntivo na região da lesão e aumento da permeabilidade dos capilares e migração de células polimorfonucleares para a região. Como resultado, ocorre um aumento no fluxo de fluido crevicular gengival numa tentativa de diluir e eliminar as substâncias nocivas produzidas pelo biofilme da placa.

Na fase de lesão precoce ocorre um aumento no número e no tamanho dos vasos sanguíneos do plexo dentogengival. Células inflamatórias, principalmente linfócitos e neutrófilos, infiltram no tecido e os fibroblastos iniciam a degradação das fibras colágenas no tecido conjuntivo para facilitar a infiltração de células de defesa. As células da camada basal do epitélio juncional e sulcular proliferam, para aumentar a barreira física entre o biofilme bacteriano e o tecido conjuntivo (Lindhe & Karring, 1999).

Já na fase estabelecida da lesão, ocorre uma intensificação do edema, aumento da exsudação do fluido e infiltração de leucócitos no epitélio e no tecido conjuntivo. Nesta etapa, o epitélio dentogengival continua a proliferar e migra apicalmente para dentro do tecido conjuntivo, numa tentativa de manter a integridade epitelial e a barreira à entrada microbiana. Não há perda óssea

considerável. Por fim, na fase de lesão avançada é observado um aumento da profundidade do sulco periodontal e a microbiota passa ter nichos anaeróbicos. Ocorre extensa degradação das fibras colágenas e reabsorção óssea. As bactérias também causam destruição dos tecidos periodontais indiretamente, exacerbando a resposta imune do hospedeiro (Nanci & Bosshardt, 2006; Kayal, 2013).

O papel da placa bacteriana no desenvolvimento e progressão dessas doenças tem sido descrito há mais de 40 anos (Tatakis & Kumar, 2005). Entretanto, é observado que nem todos os casos de gengivite evoluem para a periodontite, sugerindo que o acúmulo de placa bacteriana é uma condição necessária, mas não suficiente por si só, para induzir o desenvolvimento da DP: um hospedeiro susceptível é um fator importante na gênese e progressão da doença (Graves, 1999).

Os hormônios sexuais esteróides (estrógeno, progesterona e a testosterona) influenciam a patogênese da doença periodontal, pois alteram tanto a resposta tecidual à placa bacteriana quanto a própria microbiota (Kornman *et al.*, 1980; Soori, 2000).

Estudos demonstram que a diminuição nas concentrações de testosterona nos homens está relacionada a alterações no osso alveolar, como o aumento da porosidade alveolar, alteração no padrão trabecular, reabsorção óssea alveolar, diminuição da densidade mineral óssea na maxila e mandíbula e aumento na secreção de interleucinas (IL-1 IL-6) (Sooriyamoorthy & Gower, 1989; Samelson *et al.*, 2006; Kuo *et al.*, 2008). Na presença da periodontite crônica, estas alterações são mais acentuadas e podem levar a perda dentária (Shing *et al.*, 2011). Em animais experimentais, Steffens *et al.*, (2012)

demonstraram que a queda nas concentrações de testosterona, em decorrência da orquidectomia bilateral, associada à doença periodontal induzida por ligadura, aumentou significativamente a perda óssea nos animais. Assim, a compreensão dos mecanismos moleculares, fisiológicos e das alterações teciduais que relacionam a deficiência de testosterona com as alterações patológicas periodontais, é um importante tema da saúde masculina que necessita de mais investigações.

Objetivos

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivos gerais

Analisar a influência da deficiência de testosterona sobre a perda óssea alveolar e estrutura histológica dos tecidos periodontais de ratos castrados e com periodontite experimental.

5.2. Objetivos específicos

- Analisar os efeitos da castração e da periodontite experimental sobre:
 - Estrutura histológica dos tecidos periodontais;
 - Avaliar a perda óssea, por meio da mensuração da distância entre a junção cimento-esmalte e a crista alveolar por meio de imagem radiográfica;
 - Realizar a análise morfométrica do tecido conjuntivo e epitélio gengival.

Materiais e Métodos

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Animais

Foram utilizados 28 ratos machos *Wistar*, com 80 dias de idade, fornecidos pelo Biotério da Unioeste, Cascavel-PR. Os animais foram adaptados e mantidos no Biotério Setorial do CCBS/Unioeste – Campus de Cascavel, em gaiolas coletivas de polietileno (43x30x15), sob condições controladas de temperatura entre 22° e 25°C, umidade relativa próxima de 55% e fotoperíodo de 12 horas (período de luz 7:00~19:00h). Os procedimentos experimentais foram aprovados para execução pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (anexo 1).

6.2. Grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente separados em quatro grupos experimentais: (CON) controle sem ligadura, (COM+LIG) controle com ligadura, (CAST) castrado sem ligadura e (CAST+LIG) castrado com ligadura. Todos os grupos com 7 animais.

Para a realização da técnica de castração os animais com 90 dias foram submetidos à cirurgia com anestesia intraperitoneal de 75 mg de ketamina e 15mg de xilazina, por quilo de peso corporal. Foi realizada a abertura do escroto na linha média com incisão de 2 cm e dissecação até a exposição dos testículos. Os testículos foram retirados após prévia ligadura do cordão espermático com fio de algodão 3-0. No grupo controle, os testículos foram expostos, manipulados e reinseridos no escroto, sob as mesmas condições experimentais dos animais castrados. Todos os grupos tiveram a bolsa

testicular fechada com pontos simples de fios de nylon 4-0. Sessenta dias após a castração, foi induzida a periodontite experimental nos grupos específicos através da técnica de ligadura (Nassar *et al.*, 2003; Spolidorio *et al.*, 2005; Steffens *et al.*, 2012). Para tanto os animais foram anestesiados (via intraperitoneal com ketamina 75 mg/Kg e xilazina 15 mg/Kg), e posicionados em mesa operatória apropriada, permitindo a abertura bucal dos ratos, facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Com o auxílio de uma pinça modificada e de uma sonda exploradora, foi colocado um fio de algodão número 40 ao redor do primeiro molar inferior direito e esquerdo. Esta ligadura atuou como irritante gengival por 30 dias e favoreceu o acúmulo de placa bacteriana.

6.3. Coleta do material e obtenção dos cortes em Paraplast

Ao final do período experimental (90 dias após a castração), todos os animais foram pesados e sacrificados em câmara de CO₂. A mandíbula foi retirada, seccionadas sagitalmente e separada em direita e esquerda, fixada em formalina tamponada a 10% por 24 horas. Após este período todas as amostras foram lavadas em água corrente e mantidas em álcool 70°.

As hemi-mandíbulas esquerdas foram radiografadas e posteriormente descalcificadas em solução de ácido descalcificante (Allkimia®) por 19 horas e estocado em álcool 70°. Após este período, ambas as amostras foram desidratadas em série crescente de alcoóis, diafanizada em xilol e incluídas em Paraplast. Para as análises histomorfométricas, foram realizados cortes no plano coronal, sentido de mesial para distal (ântero-posterior), com 5µm de espessura, utilizando micrótomo rotativo manual (Olympus 4060), equipado

com navalha de aço. Os cortes obtidos foram desparafinizados com xilol, hidratados com água destilada e submetidos à técnica de coloração: hematoxilina-eosina (HE) para análise.

6.4. Avaliação Radiográfica

As hemi-mandíbulas esquerdas, antes do início da descalcificação, foram radiografadas por um único examinador treinado, em dois dias diferentes, utilizando aparelho de raio-x odontológico da marca X-Dent D70, kva 70 amp/60 Hz, com sensor radiográfico do tamanho oclusal do fabricante DURR DENTAL VISTA, com tempo cerca de 0,10s, com distância focal de 50 cm, de maneira que o feixe de raios incida perpendicularmente a peça e ao sensor (Nassar *et al.*, 2003). As peças foram posicionadas para que a superfície lingual da hemi-mandíbula ficasse em íntimo contato com o filme. A leitura do sensor foi realizada pelo leitor da DURR DENTAL VISTA SCAN MINI, com registro na SNB 224702049. As imagens obtidas foram analisadas com o programa Image Tool 3.0.

6.5. Análise histomorfométrica

As análises da área do epitélio gengival e do tecido conjuntivo subjacente foram realizadas conforme descrito em Steffens *et al.*, (2012). As secções histológicas foram fotografadas no aumento de 100x, em microscópio óptico de luz (Leica Microsystems, Switzerland), com o uso do sistema de contagem e captura LAS V4.2 (Leica Microsystem) e 4 medidas foram realizadas: altura e largura do epitélio gengival, altura e largura do tecido conjuntivo. O cálculo da área foi realizado multiplicando a altura e largura das

respectivas regiões (Figura 1).

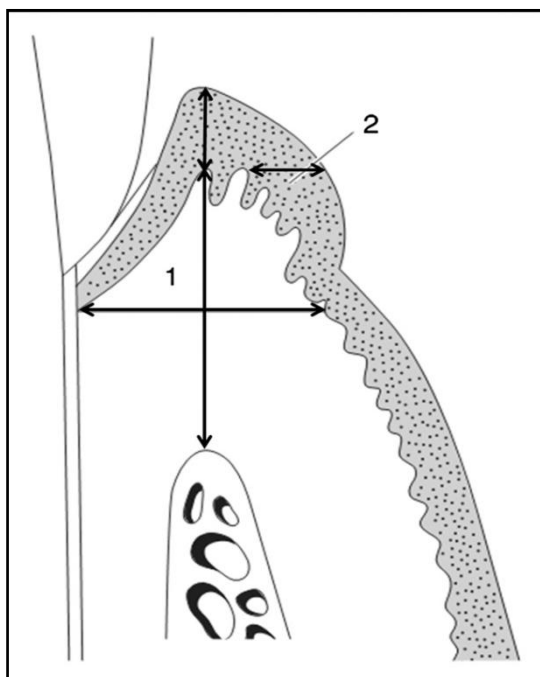


Figura 1. Diagrama ilustrando as medidas realizadas para a avaliação das áreas de tecido epitelial gengival e tecido conjuntivo. 1: altura (seta vertical) e largura (seta horizontal) do tecido conjuntivo. 2: altura (seta vertical) e largura (seta horizontal) do epitélio gengival (Steffens et., al, 2012)

6.6. Análise Estatística

Para análise dos dados foi utilizado o teste estatístico para análise de variância - ANOVA, com teste “a posteriori” de Tuckey-Kramer ou o teste não paramétrico de Kruskall-Wallis, com teste “a posteriori” de Dunn, de acordo com a característica de cada variável. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no programa InStat versão 3.0 (GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA).

Resultados

7. RESULTADOS

7.1. Padrão de consumo alimentar

Os animais dos diferentes grupos experimentais não apresentaram diferenças significativas no padrão de consumo alimentar (Figura 2).

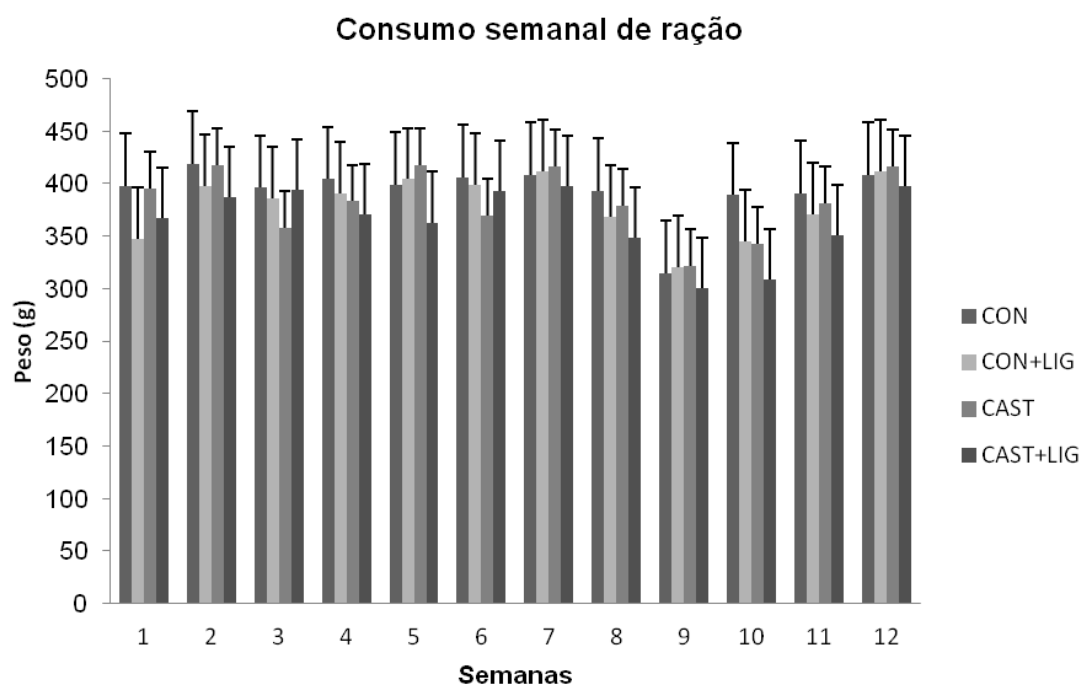


Figura 2. Gráfico de ingestão semanal de ração por grupo experimental. Valores expressos em média \pm DP. Teste de Tukey-Kramer; $p < 0,05$. $n = 7$ animais por grupo.

7.2. Peso corporal dos animais

Os animais castrados, com ou sem periodontite, ao final do período experimental apresentaram diminuição no peso corporal quando comparados aos outros grupos (tabela 1).

Tabela 1. Peso corporal inicial (g) e peso corporal final (g), dos animais dos diferentes grupos experimentais.

	CON	CON+LIG	CAST	CAST+LIG
Peso corporal inicial (g)	329,57 ± 18,95	332,57 ± 15,75	331,85 ± 16,19	329,85 ± 15,38
Peso corporal final (g)	447,83 ± 22,06 ^a	444,87 ± 23,75 ^a	414,71 ± 19,32 ^b	416,61 ± 20,30 ^b

Valores expressos em média ± DP. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,01$). Teste de Tukey-Kramer; n= 7 animais por grupo.

7.3. Avaliação radiográfica

Os animais com periodontite experimental (CON+LIG e CAST+LIG) apresentaram maior distância da junção cimento-esmalte em relação à crista óssea alveolar ($p < 0,01$), quando comparado aos grupos sem ligadura (CON e CAST). A perda óssea alveolar foi maior nos animais do grupo CAST+LIG ($p < 0,01$), quando comparado ao grupo CON+LIG (Figuras 03 e 04).

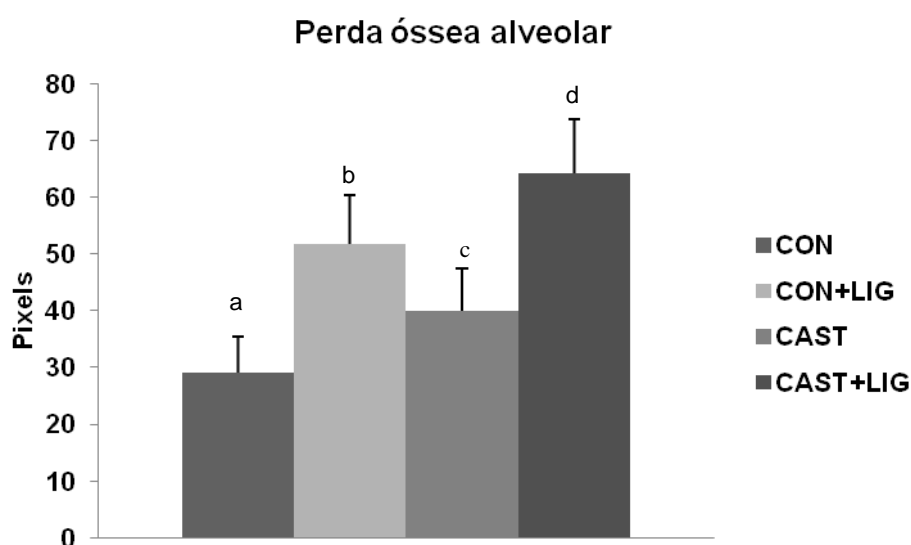


Figura 3. Distância da junção cimento-esmalte em relação à crista óssea alveolar dos animais dos diferentes grupos experimentais. Valores expressos em média \pm DP. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,01$). Teste de Tukey-Kramer; $n = 7$ animais por grupo.

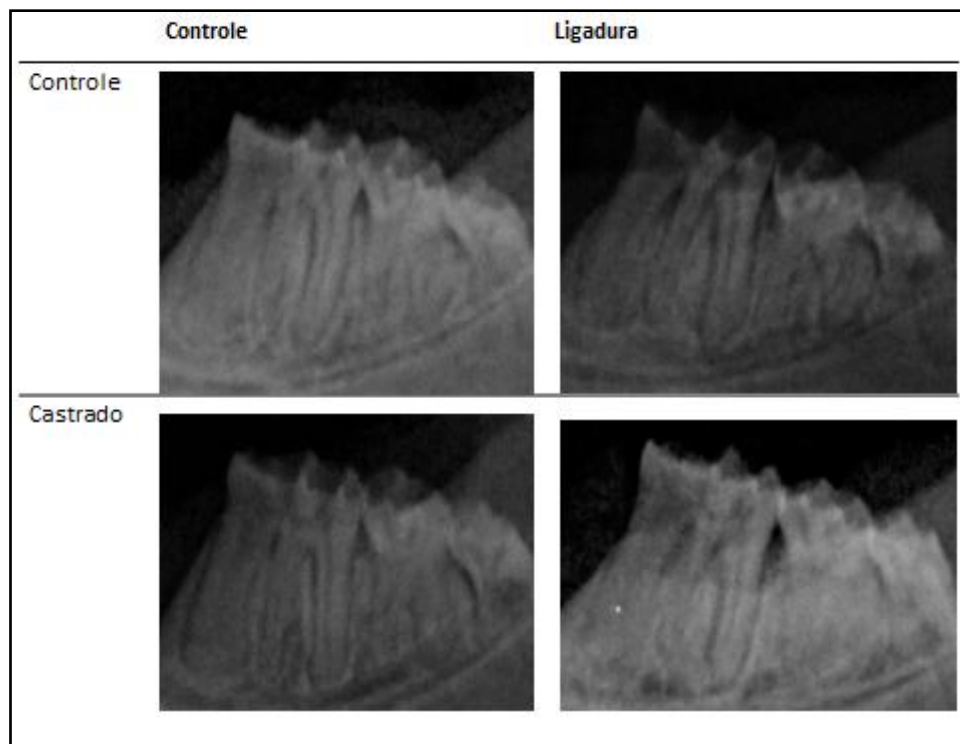


Figura 4. Imagens radiográficas representativas dos grupos experimentais.

7.4. Análise histomorfométrica

Os animais com periodontite experimental (CON+LIG e CAST+LIG) apresentaram aumento na área de epitélio gengival ($p < 0,001$), quando comparados ao grupo controle (CON). Na ausência de testosterona, a área de epitélio gengival foi maior nos animais com ligadura (CAST+LIG), quando comparado aos animais castrados sem ligadura ($p < 0,01$) (Tabela 2).

A área de tecido conjuntivo foi maior nos animais com periodontite experimental (CON+LIG e CAST+LIG), quando comparados aos grupos sem ligadura (CON e CAST; $p < 0,01$) (Tabela 2).

Tabela 2. Área (μm^2) de epitélio gengival e de tecido conjuntivo dos animais dos diferentes grupos experimentais.

	CON	CON+LIG	CAST	CAST+LIG
Área de epitélio gengival μm^2	6,86 \pm 1,64 ^a	8,14 \pm 1,47 ^b	7,54 \pm 1,61 ^{a,b}	8,85 \pm 1,53 ^c
Área de tecido conjuntivo μm^2	149,13 \pm 33,78 ^a	485,07 \pm 38,45 ^b	153,12 \pm 36,52 ^a	537,33 \pm 34,45 ^b

Valores expressos em média \pm DP. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,01$). Teste de Tukey-Kramer; n= 7 animais por grupo.

Discussão

8. DISCUSSÃO

A deficiência de testosterona, ou hipogonadismo, é uma condição clínica na qual as concentrações de testosterona nos homens diminui, levando à diversas alterações fisiopatológicas no organismo. Afeta cerca de 30% dos homens com idade entre 40-79 anos (Miner *et al.*, 2014) e, além do envelhecimento, doenças como diabetes, hipertensão e obesidade, estão listadas entre as principais causas do aumento da prevalência do hipogonadismo nos homens (Traish *et al.*, 2011).

A castração de roedores, realizada no presente estudo, tem sido utilizada experimentalmente em diferentes estudos com o objetivo de compreender melhor as consequências da deficiência de testosterona em homens hipogonadais (Xia *et al.*, 2013; Steffens *et al.*, 2012).

Além do seu papel na endocrinologia reprodutiva a testosterona está fortemente relacionada com a composição corporal, influenciando o metabolismo de lipídios e proteínas. Em homens a diminuição de T está relacionada a uma diminuição da massa muscular e aumento da quantidade de gordura corporal, podendo levar à obesidade e síndrome metabólica (Traish *et al.*, 2011; Smith, 2004). Características típicas da síndrome metabólica, assim como aumento de peso corporal, também têm sido observado em gatos e cachorros castrados (McGreevy *et al.*, 2005; Kanchuk *et al.*, 2002,2003).

Diferentemente, no presente trabalho, os animais castrados apresentaram uma redução do peso corporal, quando comparados aos animais não castrados, embora nenhuma alteração no padrão de consumo alimentar tenha sido observada. Assim como em nosso estudo, outros trabalhos experimentais com roedores têm demonstrado uma diminuição do peso

corporal e da massa muscular em ratos e camundongos após a castração (White *et al.*, 2013; Christoffersen *et al.*, 2006). As razões para as diferenças inter-espécies não são claras, mas podem estar relacionada aos vários efeitos da deficiência de testosterona sobre a atividade física e gasto energético dos organismos, bem como no apetite e ingestão de alimentos (Inoue *et al.*, 2010). A deficiência de testosterona está relacionada à uma redução da produção e secreção de GH (hormônio do crescimento), um importante regulador do crescimento, desenvolvimento somático e composição corporal, levando a uma diminuição das concentrações de IGF-1, um dos principais mediadores das ações anabólicas do GH (Meinhardt & Ho, 2006), o que pode estar relacionado a um maior catabolismo de proteínas e consequente diminuição da massa muscular observada em roedores (White *et al.*, 2013), o que justifica a perda de peso observado nos nossos animais.

Outro importante alvo das ações androgênicas no organismo é no tecido ósseo. O hipogonadismo em homens está associado à diminuição da densidade óssea mineral, aumentando os riscos de fraturas e osteoporose (Sinnesael *et al.*, 2011; Erben *et al.*, 2000). No contexto da odontologia, alterações na produção, secreção e concentração dos hormônios sexuais pode afetar o metabolismo ósseo alveolar, podendo contribuir com o desenvolvimento de doença periodontal e perda dentária. A doença periodontal, ou periodontite, é uma doença inflamatória e infecciosa que resulta na destruição dos tecidos de suporte dos dentes, podendo levar a perda dentária (Mealey & Rethman, 2003). O papel da testosterona na progressão da doença periodontal ainda não foi totalmente elucidado (Shing *et al.*, 2011).

No presente estudo, todos os animais com periodontite induzida experimentalmente apresentaram uma maior perda óssea alveolar, quando comparados aos animais dos grupos controle e castrado sem ligadura, confirmando assim a validade do modelo experimental (Abe & Hajishengallis, 2013). A castração, isoladamente, resultou em uma perda óssea alveolar maior do que a observada nos animais do grupo controle. Os mecanismos pelos quais a testosterona influencia o metabolismo ósseo ainda não estão totalmente esclarecidos (Filipovic *et al.*, 2007). A ação da testosterona sobre o tecido ósseo pode ser direta, via receptores de andrógenos, ou indiretamente através da regulação de fatores de crescimento.

Estudos demonstram que os osteoblastos, tanto em humanos quanto em animais experimentais, expressam receptores de andrógeno (Colvard *et al.*, 1989; Orwoll *et al.*, 1991; Van Der Eerden *et al.*, 2002), e pesquisadores demonstraram que os andrógenos são capazes de estimular a proliferação e diferenciação de células osteoblásticas (Kasperk *et al.*, 1997). Assim, a perda óssea decorrente da castração pode ser consequência de um prejuízo na formação de tecido ósseo. Chin & Ima-Nirwana (2014) demonstraram que a reposição suprafisiológica de testosterona em ratos castrados é capaz de prevenir as alterações degenerativas do tecido ósseo observada nos animais. Gill *et al.*, (1998) demonstraram que a deficiência de testosterona diminui a produção do fator transformador de crescimento (TGF β) pelos osteoblastos em roedores. Estudos demonstraram que o (TGF β) produzido pelos osteoblastos (Finkelman *et al.*, 1992; Bodine *et al.*, 1995) aumenta a formação de osso e inibe a reabsorção óssea em seres humanos e ratos (Mackie & Trechsel, 1990; Joyce *et al.*, 1990).

Entretanto, a maior perda óssea alveolar foi observada nos animais castrados e com periodontite. A deficiência de testosterona é a principal responsável pela osteoporose em homens (Wang *et al.*, 2013). A osteoporose está relacionada a uma diminuição da densidade mineral óssea de todo o esqueleto, inclusive da maxila e da mandíbula, resultando em aumento da porosidade óssea alveolar, alteração do padrão trabecular e aumento na velocidade da reabsorção do osso alveolar, após a invasão por patógenos periodontais. Além disso, fatores sistêmicos que afetam a remodelação óssea podem também modificar a resposta local do tecido a infecção periodontal, tais como o aumento da liberação sistêmica de interleucina-1 e interleucinas-6, as quais estimulam a atividade osteoclástica, resultando em perda óssea (Kuo *et al.*, 2008; Zeeman *et al.*, 2001; Sooriyamoorthy & Gower, 1989).

Nos animais castrados e com periodontite induzida, a área gengival foi maior quando comparado aos demais grupos experimentais. Yarrow *et al.*, (2010) demonstraram que o tecido ósseo atua como um reservatório de hormônios sexuais, com potenciais efeitos biológicos em diferentes tecidos. Estes autores demonstraram que a castração de roedores, embora tenha diminuído significativamente a concentração de hormônios sexuais na circulação sanguínea, não alterou a concentração de hormônios armazenados no tecido ósseo, mas também não impediu a diminuição da densidade mineral óssea dos animais, o que sugere que os esteróides sexuais intraesqueléticos estão sequestrados em um compartimento ósseo que não é capaz de proteger contra a perda óssea. Steffens *et al.*, (2012) sugerem que a conversão de testosterona em diidrotestosterona (DHT) ocorra no reservatório ósseo, após a

castração, e o aumento de DHT intra-ósseo poderia estar envolvido nos mecanismos de regulação do aumento da área de epitélio gengival.

Não observamos alterações significativas na área de tecido conjuntivo que pudesse ser atribuída a uma regulação androgênica. A área de conjuntivo foi maior nos animais com periodontite induzida, independente da castração. Esta observação relaciona-se ao processo inflamatório característico da doença periodontal. A liberação de mediadores inflamatórios e interleucinas, principalmente a interleucina-1, estão relacionadas ao aumento da produção de colágeno pelos fibroblastos gengivais. Além disso, o processo inflamatório desencadeado pela doença periodontal leva a um aumento do edema e da vascularização, com aumento da formação de vasos sanguíneos no plexo gengival (Kayal, 2013).

Conclusões

9. CONCLUSÕES

Concluimos que a testosterona é um importante regulador fisiológico do metabolismo ósseo alveolar. A deficiência de testosterona em sinergismo com a doença periodontal aumenta a reabsorção óssea alveolar e altera a espessura do epitélio gengival.

Referências Bibliográficas

10. REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS

- ABE T.; HAJISHENGALLIS, G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. **J Immunol Methods.**, v. 394(1-2), p.49-54, 2013.
- BAGATELL, C. J.; BREMNER W. J. Androgens in men – uses and abuses. **N Engl J Med.**, v. 334(11), p.707-714, 1996.
- BASSIL, N.; MORLEY, J.E. Late-life onset hypogonadism: a review. **Clin Geriatr Med.**, v. 26(2), p. 197-222, 2010.
- BODINE, P.V.; RIGGS, B.L.; SPELSBERG, T.C. Regulation of c-fos expression and TGF-beta production by gonadal and adrenal androgens in normal human osteoblastic cells. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v.52(2), p.149-158, 1995.
- CHIN, K.Y.; IMA-NIRWANA, S. The effects of orchidectomy and supraphysiological testosterone administration on trabecular bone structure and gene expression in rats. **Aging Male.**, v.28(1), p.1-7, 2014.
- CHO, M.I.; GARANT, P.R. Development and general structure of the periodontium. **Periodontol 2000.**, v. 24(1), p. 9-27, 2000.
- CHOUDHURY, B.K.; CHOUDHURY, S.D.; SAIKIA, U.K.; SARMA, D. Gonadal function in young adult males with metabolic syndrome. **Diabetes Metab Syndr.**, v. 7(3), p.129-132, 2013.
- CHRISTOFFERSEN, B.; RAUN, K.; SVENDSEN, O.; FLEDELIUS, C.; GOLOZOUBOVA, V. Evaluation of the castrated male Sprague-Dawley rat as a model of the metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Int J Obes.**, v. 30(8), p.1288-1297, 2006.
- COLVARD, D.S.; ERIKSEN, E.F.; KEETING, P.E.; WILSON, E.M.; LUBAHN, D.B.; FRENCH, F.S.; RIGGS, B.L.; SPELSBERG, T.C. Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.86(3), p.854-857, 1989.
- COSTANZO, L.S. Physiology. **Saunders Elsevier**, 3rd ed, 2006.
- DALTABAN, O.; SAYGU N, I.; BOLU.E. Periodontal status in men with hypergonadotropic hypogonadism: effects of testosterone deficiency. **J Periodontol.**, v.77(7), p. 179-183, 2006.

- DANDONA, P.; ROSENBERG, M.T. A practical guide to male hypogonadism in the primary care setting. **Int J Clin Pract.**, v.64(6), p.682-696, 2010.
- DI BENEDETTO, A.; GIGANTE, I.; COLUCCI, S.; GRANO, M. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. **Clin Dev Immunol.**, doi: 10.1155/2013/503754, 2013.
- EKE, P.I.; DYE, B.A.; WEI, L.; THORNTON-EVANS, G.O.; GENCO, R.J.; BECK, J.; DOUGLASS, G.; PAGE, R. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. **J Dent Res.**; v.91(10), p.914-920, 2012.
- ERBEN, R.G.; EBERLEM J.; STAHR, K.; GOLDBERG, M. Androgen deficiency induces high turnover osteopenia in aged male rats: a sequential histomorphometric study. **J Bone Miner Res.**, v.15(6), p.1085-1098, 2000.
- FERRARIS, F.; ALCIDI, R.; FERRARIS, M. Aesthetic rehabilitation and functional periodontal stabilization using metal-ceramic restorations. **Pract Proced Aesthet Dent.**, v.18(2), p.115-117, 2006.
- FERRARIS, M.E.G.; MUNHOZ, A.C. *Histologia e Embriologia Bucodental*. 2ª ed. Rio de Janeiro, RJ: **Guanabara Koogan**, 2006.
- FILIPOVIĆ, B.; SOSIĆ-JURJEVIĆ, B.; AJDZANOVIĆ, V.; TRIFUNOVIĆ, S.; MANOJLOVIĆ-STOJANOSKI, M.; RISTIĆ, N.; NESTOROVIĆ, N.; MILOSEVIĆ, V.; SEKULIĆ, M. The effect of orchidectomy on thyroid C cells and bone histomorphometry in middle-aged rats. **Histochem Cell Biol.**, v.128(2), p.153-159, 2007.
- FINKELMAN, R.D.; BELL, N.H.; STRONG, D.D.; DEMERS, L.M.; BAYLINK, D.J. Ovariectomy selectively reduces the concentration of transforming growth factor beta in rat bone: implications for estrogen deficiency-associated bone loss. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.89(24), p.12190-12193, 1992.
- FOSTER, B.L. Methods for studying tooth root cementum by light microscopy. **Int j oral sci.**, v 4(3), p.119-128, 2012.
- FOSTER, B.L.; SOENJAVA, Y.; NOCITI JR, F.H.; HOLM, E.; ZERFAS, P.M.; WIMER, H.F.; HOLDSWORTH, D.W.; AUBIN, J.E.; HUNTER, G.K.; GOLDBERG, H.A.; SOMERMAN, M.J. Deficiency in acellular cementum and periodontal attachment in bsp null mice. **J Dent Rest.**, v.92(2), 166-172, 2013.

- GILL, R.K.; TURNER, R.T.; WRONSKI, T.J.; BELL, N.H. Orchiectomy markedly reduces the concentration of the three isoforms of transforming growth factor beta in rat bone, and reduction is prevented by testosterone. **Endocrinology.**, v.139(2), p.546–550, 1998.
- GOOREN, L.J. Androgens and male aging: Current evidence of safety and efficacy. **Asian J Androl.**, v.12(2), p.136-151, 2010.
- GRAVES, D.T.; FINE, D.; TENG, Y.T.; VAN DYKE, T.E.; HAJISHENGALLIS, G. The use of rodent models to investigate host–bacteria interactions related to periodontal diseases. **J Clin Periodontol.**, v.35(2), p.89-105, 2008.
- HARING, R.; BAUMEISTER, S.E.; VÖLZKE, H.; DÖRR, M.; FELIX, S.B.; KROEMER, H.K.; NAUCK, M.; WALLASCHOFSKI, H. Prospective association of low total testosterone concentrations with an adverse lipid profile and increased incident dyslipidemia. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.**, v.18(1), p. 86-96, 2011.
- HARING, R.; BAUMEISTER, S.E.; VÖLZKE, H.; DÖRR, M.; KOCHER, T.; NAUCK, M.; WALLASCHOFSKI, H. Prospective inverse associations of sex hormone concentrations in men with biomarkers of inflammation and oxidative stress. **J Androl.**, v.33(5), p. 944-950, 2012.
- HARING, R.; ITTERMANN, T.; VOLZKE, H.; KREBS, A.; ZYGMUNT, M.; FELIX, S.B.; GRABE, H.J.; NAUCK, M.; WALLASCHOFSKI, H. Prevalence, incidence and risk factors of testosterone deficiency in a population-based cohort of men: results from the study of health in Pomerania. **Aging Male.** v.13(4), p. 247-257, 2010.
- INOUE, T.; ZAKIKHANI, M.; DAVID, S.; ALGIRE, C.; BLOUIN, M.J.; POLLAK, M. Effects of castration on insulin levels and glucose tolerance in the mouse differ from those in man. **Prostate.**, v.70(15), p.1628-1635, 2010.
- JOYCE, M.E.; ROBERTS, A.B.; SPORN, M.B.; BOLANDER, M.E. Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. **J Cell Biol.**, v.110(6), p.2195-2207, 1990.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 10^a Ed. Rio de Janeiro, RJ: **Guanabara Koogan**, 2004.
- KANCHUK, M.L.; BACKUS, R.C.; CALVERT, C.C.; MORRIS, J.G.; ROGERS, Q.R. Neutering induces changes in food intake, body weight, plasma

- insulin and leptin concentrations in normal and lipoprotein lipase-deficient male cats. **J Nutr.**, v. 132(6), p.1730-1732, 2002.
- KANCHUK, M.L.; BACKUS, R.C.; CALVERT, C.C.; MORRIS, J.G.; ROGERS, Q.R. Weight gain in gonadectomized normal and lipoprotein lipase-deficient male domestic cats results from increased food intake and not decreased energy expenditure. **J Nutr.**, v.133(6), p.1866-1874, 2003.
- KASPERK, C.; HELMBOLDT, A.; BÖRCSÖK, I.; HEUTHE, S.; CLOOS, O.; NIETHARD, F.; ZIEGLER, R. Skeletal site-dependent expression of the androgen receptor in human osteoblastic cell populations. **Calcif Tissue Int.**, v.61(6), p.464-473, 1997.
- KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. *Histologia e Embriologia Oral*. 3ª Ed. Rio de Janeiro, RJ: **Guanabara Koogan**, 2012.
- KAUFMAN, J.M.; VERMEULEN, A. The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. **Endocr Rev.**, v.26(6), p. 833-876, 2005.
- KAYAL, R.A. The role of osteoimmunology in periodontal disease. **Biomed Res Int.**, doi: 10.1155/2013/639368, 2013.
- KORNMAN, K.S.; LOESCHE, W.J. The subgingival microbial flora during pregnancy. **J Periodontal Res.**, v.15(2), p. 111-122, 1980.
- KUO, L.C.; POLSON, A.M.; KANG, T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. **Public Health.**, v.122(4), p. 417-433, 2008.
- LINDHE, J.; KARRING, T. Anatomia do Periodonto. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. Rio de Janeiro:RJ; 3 ed., p. 3-42, 1999.
- MACKIE, E.J.; TRECHSEL, U. Stimulation of bone formation in vivo by transforming growth factor-beta: remodeling of woven bone and lack of inhibition by indomethacin. **Bone.**, v.11(4), p.295-300,1990.
- MARIOTT, A. Sex Steroid Hormones and Cell Dynamics in the Periodontium. **Crit Rev Oral Biol Med.**, v. 5(1), p. 27-53, 1994.
- MARIOTTI, A.; MAWHINNEY, M. Endocrinology of sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. **Periodontol 2000.**, v.61(1), p. 69-88, 2013.

- MCGREEVY, P.D.; THOMSON, P.C.; PRIDE, C.; FAWCETT, A.; GRASSI, T.; JONES, B. Prevalence of obesity in dogs examined by Australian veterinary practices and the risk factors involved. **Vet Rec.**, v.156(22), p.695–702, 2005.
- MEALEY, B.L.; RETHMAN, M.P. Periodontal disease and diabetes mellitus. Bidirectional relationship. **Dent Today.**, v.22(4), p.107-113, 2003.
- MEINHARDT, U.J.; HO, K.K. Modulation of growth hormone action by sex steroids. **Clin Endocrinol.**, v.65(4), p.413-422, 2006.
- MINER, M.; BARKIN, J.; ROSENBERG, M.T. Testosterone deficiency: myth, facts, and controversy. **Can J Urol.**, v.21(2), p.39-54, 2014.
- MONTANDON, A.; ZUZA, E.; TOLEDO, B.E. Prevalence and reasons for tooth loss in a sample from a dental clinic in Brazil. **Int J Dent.**, doi: 10.1155/2012/719750, 2012.
- MOORADIAN, A.D.; MORLEY, J.E.; KORENMAN, S.G. Biological actions of androgens. **Endocr Rev.**, v.8(1), p. 1-28, 1987.
- NANCI, A.; BOSSHARDT, D.D. Structure of periodontal tissues in health and disease. **Periodontol 2000.**, v. 40(1), p.11-28, 2006.
- NASSAR, C. A. ; GIRELLI-JUNIOR, C. ; NASSAR, P. O. ; INAGAKI, N. S. Efeito de um antiinflamatório no desenvolvimento da doença periodontal induzida. Avaliação radiográfica em ratos. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 32(2), p. 125-130, 2003.
- ORWOLL, E.S.; STRIBRSKA, L.; RAMSEY, E.E.; KEENAN, E.J. Androgen receptors in osteoblast-like cell lines. **Calcif Tissue Int.**, v.49(3), p.183-187, 1991.
- PAGE, R.C.; SCHROEDER, H.E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. **Lab Invest.**, v.34(3), p.235-249, 1976.
- PARDRIDGE, W.M. Serum bioavailability of sex steroid hormones. **Clin Endocrinol Metab.**, v.15(2), p. 259-278, 1986.
- SAMELSON, E.J.; HANNAN, M.T. Epidemiology of osteoporosis. **Curr Rheumatol Rep.**, v.8(1), p. 76-83, 2006.
- SCHIPF, S.; HARING, R.; FRIEDRICH, N.; NAUCK, M.; LAU, K.; ALTE, D.; STANG, A.; VÖLZKE, H.; WALLASCHOFSKI, H. Low total testosterone is associated with increased risk of incident type 2 diabetes mellitus in men:

- results from the Study of Health in Pomerania (SHIP). **Aging Male**. v.14(3), p.168-175, 2011.
- SINGH, B.P.; MAKKER, A.; TRIPATHI, A.; SINGH, M.M.; GUPTA, V. Association of testosterone and bone mineral density with tooth loss in men with chronic periodontitis. **J Oral Sci.**, v.53(3), p. 333-339, 2011.
- SINNESAEL, M.; BOONEN, S.; CLAESSENS, F.; GIELEN, E.; VANDERSCHUEREN, D. Testosterone and the male skeleton: a dual mode of action. **J Osteoporos.**, doi: 10.4061/2011/240328, 2011.
- SMITH, M.R. Changes in fat and lean body mass during androgen-deprivation therapy for prostate cancer. **Urology**. v.63(4), p.742-745, 2004.
- SOORIYAMOORTHY, M.; GOWER, D.B. Hormonal influences on gingival tissue: relationship to periodontal disease. **J Clin Periodontol.**, v.16(4), p. 201-208, 1989.
- SOORY, M. Targets for steroid hormone mediated actions of periodontal pathogens, cytokines and therapeutic agents: some implications on tissue turnover in the periodontium. **Curr Drug Targets.**, v.4(1), p. 309-325, 2000.
- SOLIDORIO, L.C.; SOLIDORIO, D.M.; HOLZHAUSEN, M.; NASSAR, P.O.; NASSAR, C.A. Effects of long-term cyclosporin therapy on gingiva of rats – analysis by stereological and biochemical estimation. **Braz Oral Res.**, v.19(2), p. 112-118, 2005.
- STEFFENS, J.P.; COIMBRA, L.S.; RAMALHO-LUCAS, P.D.; ROSSA, C.JR.; SOLIDORIO, L.C. The effect of supra- and subphysiologic testosterone levels on ligature-induced bone loss in rats – a radiographic and histologic pilot study. **J Periodontol.**, v. 83(11), p. 1432-1439, 2012.
- SVARTBERG, J.; VON MÜHLEN. D.; SCHIRMER , H.; BARRETT-CONNOR, E.; SUNDFJORD, J.; JORDE, R. Association of endogenous testosterone with blood pressure and left ventricular mass in men. **Eur J Endocrinol.**, v.150(1), p. 65-71, 2004.
- TATAKIS, D.N.; KUMAR, P.S. Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. **Dent Clin North Am.**, v. 49(3), p.491-516, 2005.
- TEN CATE, A.R. Histologia Bucal. Desenvolvimento, Estrutura e Função. 5ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2001.

- TENOVER, J.S. Declining testicular function in aging men. **Int J Impot Res.**, v.15 suppl 4:S3-8, 2003.
- TORKLER, S.; WALLASCHOFSKI, H.; BAUMEISTER, S.E.; VÖLZKE, H.; DÖRR, M.; FELIX, S.; RETTIG, R.; NAUCK, M.; HARING, R. Inverse association between total testosterone concentrations, incident hypertension and blood pressure. **Aging Male.** v.14(3), p. 176-182, 2011.
- TRAISH, A.M.; MINER, M.M.; Morgentaler, A.; Zitzmann, M. Testosterone deficiency. **Am J Med.**, v.124(7), p.578-587, 2011.
- VAN DER EERDEN, B.C.; VAN TIL, N.P.; BRINKMANN, A.O.; LOWIK, C.W.; WIT, J.M.; KAPERIEN, M. Gender differences in expression of androgen receptor in tibial growth plate and metaphyseal bone of the rat. **Bone.**, v.30(6), p.891-896, 2002.
- VANDERSCHUEREN, D.; VANDENPUT, L.; BOONEN, S.; LINDBERG, M.K.; BOUILLON, R.; OHLSSON, C. Androgens and bone. **Endocr Rev.**, v.25(3), p.389-425, 2004.
- WANG, Y.J.; ZHAN, J.K.; HUANG, W.; WANG, Y.; LIU, Y.; WANG, S.; TAN, P.; TANG, Z.Y.; LIU, Y.S. Effects of low-dose testosterone undecanoate treatment on bone mineral density and bone turnover markers in elderly male osteoporosis with low serum testosterone. **Int J Endocrinol.**, doi: 10.1155/2013/570413. 2013.
- WESPES, E.; SCHULMAN, C.C. Male andropause: myth, reality, and treatment. **Int J Impot Res.**, v.14(1), p.b93-98, 2002.
- WHITE, J.P.; GAO, S.; PUPPA, M.J.; SATO, S.; WELLE, S.L.; CARSON, J.A. Testosterone regulation of Akt/mTORC1/FoxO3a signaling in skeletal muscle. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 365(2), p.174-86, 2013.
- WILLIAMS, R.C. Periodontal disease. **N Engl J Med.**, v.322(6), p.373-382, 1990.
- XIA, F.; XU, X.; ZHAI, H.; MENG, Y.; ZHANG, H.; DU, S.; XU, H.; WU, H.; LU, Y. Castration-induced testosterone deficiency increases fasting glucose associated with hepatic and extra-hepatic insulin resistance in adult male rats. **Reprod Biol Endocrinol.**, v.18(11), p.106, 2013.
- XIAO, L.; NASU, M. From regenerative dentistry to regenerative medicine: progress, challenges, and potential applications of oral stem cells. **Stem Cells Cloning.**, v.4,(7), p.89-99, 2014.

- YARROW, J.F.; CONOVER, C.F.; LIPINSKA, J.A.; SANTILLANA, C.A.; WRONSKI, T.J.; Borst, S.E. Methods to quantify sex steroid hormones in bone: applications to the study of androgen ablation and administration. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v.299(5), p. E841-47, 2010.
- ZEEMAN, G.G.; VETH, E.O.; DENNISON, D.K. Focus on primary care: periodontal disease: implications for women's health. **Obstet Gynecol Surv.**, v.56(1), p. 43-49, 2001.
- ZIRKIN, B.R.; TENOVER, J.L. Aging and Declining Testosterone: Past, Present, and Hopes for the Future. **J Androl.**, v.33 (6), p.1111-1118, 2012.

11. ANEXO A:**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado “Avaliação dos efeitos da deficiência de testosterona sobre os tecidos periodontais de ratos com doença periodontal induzida por ligadura”, sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 09/07/2013

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2861/2012-GRE