

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

FABRICIO FERNANDES FERREIRA

**ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA E DE EXPRESSÃO GÊNICA DO
CRESCIMENTO CRANIOFACIAL APÓS SUPRESSÃO DE TESTOSTERONA: UM
ESTUDO *IN VIVO***

Alfenas/MG

2024

FABRÍCIO FERNANDES FERREIRA

**ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA E DE EXPRESSÃO GÊNICA DO CRESCIMENTO
CRANIOFACIAL APÓS SUPRESSÃO DE TESTOSTERONA: UM ESTUDO *IN VIVO***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Silva Barroso de Oliveira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Erika Calvano Küchler

Alfenas/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Ferreira, Fabrício Fernandes.

Análise microtomográfica e de expressão gênica do crescimento
craniofacial após supressão de testosterona

: um estudo in vivo

/ Fabrício Fernandes Ferreira. - Alfenas, MG, 2024.

68 f. : il. -

Orientador(a): Daniela Silva Barroso de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade
Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Orquiectomia. 2. Testosterona. 3. Maxila. 4. Mandíbula. 5. Expressão
gênica. I. Oliveira, Daniela Silva Barroso de , orient. II. Título.

FABRÍCIO FERNANDES FERREIRA

ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA E DE EXPRESSÃO GÊNICA DO CRESCIMENTO CRANIOFACIAL APÓS SUPRESSÃO DE TESTOSTERONA: UM ESTUDO IN VIVO

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Odontologia

Aprovada em: 30 de julho de 2024.

Profa. Dra. Daniela Silva Barroso de

Oliveira Presidente da Banca

Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG

Prof. Dr. Luciano Aparecido de Almeida

Júnior Instituição: Universidade Federal

de Alfenas-MG

Profa. Dra. Isabela Ribeiro Madalena

Instituição: : Centro Universitário Presidente Tancredo de Almeida Neves - São João Del Rei-MG



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Silva Barroso de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 01/08/2024, às 08:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1302375** e o código CRC **1F935BDD**.

Aos meus pais, Carlos e Cacilda, pelos ensinamentos, pela herança de caráter, de persistência e fé, características essenciais na realização de sonhos.

Aos meus irmãos, Douglas e Camila, que mesmo longe, são meu suporte em vários sentidos e momentos.

A minha esposa Fausta, minha neguinha, meu grande amor, pelo apoio, força e paciência. Minha grande companheira que sempre me incentivou e acreditou em mim.

Ao meu lindo filho, João Emanuel, presente de Deus, que com sua alegria contagiante me inspira e torna minha vida repleta de felicidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela caminhada na terra com fé e sabedoria para seguir na carreira odontológica e acadêmica.

A minha orientadora Profa. Dra. Daniela Silva Barroso de Oliveira que me acolheu neste mundo acadêmico de pesquisa científica. Aprendi muito e tenho que aprender ainda mais, agradeço pela sua atenção inesgotável, por ser minha guia e compartilharseus conhecimentos e experiência nesta jornada. Obrigado principalmente por acreditar em mim e me contagiar com sua positividade. No momento de desespero sempre a sua frase “calma, vai dar certo!” me tranquiliza. Nossa convivência me fez crescer, não apenas como profissional, mas como ser humano. Tenho que sempre agradecer a Deus por permitir que essa pessoa maravilhosa faça parte da minha vida. Minha grande amiga!!!

À minha coorientadora, Profa. Dra. Erika Calvano Kückler, gratidão pelo desenvolvimento de cada aspecto pertinente ao desenvolvimento deste estudo e por sua orientação segura que alicerça toda a equipe de pesquisa.

Ao Caio Bitencourt, um rapaz iluminado por Deus, por toda sua generosidade em todas as fases do desenvolvimento deste trabalho. Obrigado pelos dias de ajuda nos meus momentos de desespero, e a todas brilhantes sugestões e orientações que me guiaram no trabalho até aqui. Rezo pedindo a Deus que abençoe muito sua vida.

Aos discentes, Iago Ramirez e Kelly Galisteu Luiz pelo apoio na realização de todas as etapas experimentais.

A todos da minha turma de pós-graduação que tive o prazer de conhecer: Henrique, Jovânia, Maurício, Bruna, Ana Luísa, Ariana, Maria Eugenia, Lara, Sebastião, todos excelentes profissionais. Tenho muita sorte e gratidão a Deus por ter cruzado com eles nesta caminhada.

À Unifal-MG e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas pelo aceite no curso e por me permitir a obtenção deste título de mestre. Gratidão a todos os professores envolvidos, por todos ensinamentos que contribuíram em minha formação e estarão sempre presentes em minha mente.

Aos professores que colaboraram para o desenvolvimento desta pesquisa, cedendo generosamente seu espaço, tempo e fomento para que o resultado final fosse possível. Agradeço infinitamente Profs. Drs. Tomaz Henrique Araújo, Wagner Costa Rossi Junior, Alessandra Esteves, Roberto Martins Lourenço, Livia Azeredo Alves

Antunes, Leonardo dos Santos Antunes, Christian Kirschneck, Mirian Aiko Nakane Matsumoto, Maria Bernadete Sasso Stuani, Manoel Damião de Sousa Neto e Alice Corrêa Silva Sousa. Aos técnicos, Wagner Corsini, Pertrus Marques, Andrea Mendonça, Fernando Ponciano, Moacyr Clemente, Itamar Dias e Adenildes Ferreira.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (projeto nº 2021/03158-0) pelo fomento para a realização das análises de expressão gênica.

Agradeço a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP pela utilização do laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Infantil e pelo laboratório de Microtomografia do Departamento de Odontologia Restauradora, imprescindíveis na realização das etapas experimentais.

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

RESUMO

O desenvolvimento ósseo craniofacial é influenciado por diversos fatores, e um deles são os hormônios sexuais. Alterações nos níveis de testosterona afetam o crescimento craniofacial e, conseqüentemente, a estética facial e função mastigatória. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da supressão de testosterona no crescimento e desenvolvimento craniano em ratos durante a puberdade. A supressão de testosterona foi induzida por Orquiectomia (ORX) em ratos Wistar machos no grupo experimental (n=18) e cirurgia fictícia (SHAM) foi realizada no grupo controle (n=18), ambas no 23º dia de vida. Os grupos foram eutanasiados aos 45 e 73 dias de vida. Análises por microtomografia computadorizada (micro CT) e de expressão de marcadores moleculares foram realizadas nas amostras dos dois tempos experimentais. Os dados relacionados à micro CT foram comparados pelo teste de Mann-Whitney, usando software IBM SPSS Statistics. Foi feita análise de expressão de genes (biomarcadores) relacionados as proteínas *OC*, *OPN*, *RUNK2*, *MMP2* e *MMP9* envolvidas com osteogênese, de região retro molar, região de côndilo e sutura palatina pela técnica RT-PCR. Seus valores foram comparados entre os grupos pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Todos os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Na análise por micro CT, não houveram diferenças nas análises de volume ósseo/ volume total (BV/TV), conectividade trabecular (Conn. D), espaçamento trabecular (Tb. Th) e espaçamento entre trabéculas (Tb. Sp.) do côndilo e da região palatina ($p > 0,05$). Medidas lineares e angulares apresentaram diferenças entre os grupos ORX e SHAM, dentre estas o aumento do comprimento ósseo maxilar no grupo ORX (amostra de 45 dias) e aumento da largura mandibular no grupo SHAM da amostra de 73 dias ($p < 0,05$). Na análise de RT-PCR foi encontrado no grupo ORX: na região retro molar, maior expressão de genes *OC*, *MMP2*, *RUNK2*, menor expressão de *OPN* e *MMP9* na amostra de 45 dias e menor expressão de *OC*, *OPN*, *RUNK2*, *MMP2* e *MMP9* na amostra de 73 dias ($p < 0,05$); na região condilar, menor expressão apenas do gene *RUNK2* ($p < 0,05$) na amostra de 45 dias ($p < 0,05$); na região de sutura palatina, houve menor expressão dos genes *OC*, *OPN*, *RUNK2*, *MMP2* e *MMP9* na amostra de 45 dias e menor expressão de *OC*, *RUNK2*, *MMP2* e *MMP9* na amostra de 73 dias ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que a supressão de testosterona altera medidas lineares/angulares do crânio e parece promover modificações mais expressivas na direção do crescimento ósseo do que no tamanho e na qualidade do

osso. Também altera a expressão gênica de biomarcadores osteogênicos em centros de crescimento ósseo do crânio.

Palavras-chave: orquiectomia; testosterona; maxila, mandíbula; expressão gênica.

ABSTRACT

Craniofacial bone development is influenced by various factors, including sex hormones. Changes in testosterone levels affect craniofacial growth, and consequently, facial aesthetics and masticatory function. The aim of this study was to evaluate the impact of testosterone suppression on cranial growth and development in rats during puberty. Testosterone suppression was induced by orchietomy (ORX) in male Wistar rats in the experimental group (n=18), while a sham operation (SHAM) was performed in the control group (n=18), both on the 23rd day of life. The groups were euthanized at 45 and 73 days of life. Micro-computed tomography (micro-CT) analysis and molecular marker expression assays were conducted on samples from both experimental time points. Data from the micro-CT analyses were compared using the Mann-Whitney test, with IBM SPSS Statistics software. Gene expression analysis of biomarkers related to *OC*, *OPN*, *RUNX2*, *MMP2* and *MMP9*, involved in osteogenesis, was performed in the retro molar region, condylar region, and palatal suture using the RT-PCR technique. Values were compared between groups using ANOVA followed by Bonferroni post-test. All results were considered statistically significant at $p < 0.05$. Micro-CT analysis revealed no significant differences in bone volume/total volume (BV/TV), trabecular connectivity (Conn. D), trabecular thickness (Tb. Th), or trabecular spacing (Tb. Sp.) in the condylar and palatal regions ($p > 0.05$). Linear and angular measurements showed differences between the ORX and SHAM groups, such as an increase in maxillary bone length in the ORX group (45-day sample) and an increase in mandibular width in the SHAM group (73-day sample) ($p < 0.05$). In RT-PCR analysis, the ORX group exhibited the following: in the retro molar region, higher expression of *OC*, *MMP2*, and *RUNX2* genes, lower expression of *OPN* and *MMP9* in the 45-day sample, and lower expression of *OC*, *OPN*, *RUNX2*, *MMP2*, and *MMP9* in the 73-day sample ($p < 0.05$); in the condylar region, only lower *RUNX2* expression was observed ($p < 0.05$) in the 45-day sample; in the palatal suture region, there was lower expression of *OC*, *OPN*, *RUNX2*, *MMP2*, and *MMP9* in the 45-day sample, and lower expression of *OC*, *RUNX2*, *MMP2*, and *MMP9* in the 73-day sample ($p < 0.05$). The results indicate that testosterone suppression alters cranial linear/angular measurements and suggests more expressive changes in the direction of bone growth than in bone size and quality. It also alters the gene expression of osteogenic biomarkers in cranial bone growth centers.

Keywords: orchietomy; testosterone; maxilla; mandible; gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de alocação de animais.....	30
Figura 2 - Sequência da orquiectomia.....	32
Figura 3 - Pontos de referência para análise micro tomográfica crânio	36
Figura 4 - Pontos de referência para análise micro tomográfica frontal do crânio e mandíbula.....	37
Figura 5 - Ponto de segmentação do côndilo para análise quantitativa	40
Figura 6 - Ponto de segmentação do palato para análise quantitativa.....	41
Figura 7 - Regiões de segmentação para análise de expressão genica.....	42
Figura 8 - Expressão gênica de biomarcadores na região retro molar nos grupos SHAM e ORX de 45 e 73 dias mandíbula	51
Figura 9 - Expressão gênica de biomarcadores na região condilar nos grupos SHAM e ORX de 45 e 73 dias	52
Figura 10 - Expressão gênica de biomarcadores na região de sutura palatina nos grupos SHAM e ORX de 45 e 73 dias	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pontos de referência para medidas lineares e angulares	34
Tabela 2 - Medidas lineares e ângulos do crânio.....	38
Tabela 3 - Medidas lineares e ângulos mandibulares.....	39
Tabela 4 - Primers utilizados no RT – PCR.....	44
Tabela 5 - Comparação das medidas lineares e angulares do crânio (mm)	47
Tabela 6 - Comparação das medidas lineares e angulares da mandíbula(mm).....	48
Tabela 7 - Análise quantitativa do côndilo	50
Tabela 8 - Análise quantitativa do palato	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BV	Volume ósseo
TV	Volume total
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCD	Dispositivo de Carga Acoplada
cDNA	DNA complementar
Conn. D	Medida do grau de conexões da estrutura óssea
DA	Grau de anisotropia
DHT	Dihidrotestosterona
DICOM	Imagens digitais e comunicação em medicina
DP	Desvio padrão
FOV	Campo de visão
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GH	Hormônio do crescimento
GnRH	Hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofina
LH	Hormônio luteinizante
IGF-1	Fator de Crescimento semelhante à Insulina tipo 1
MICRO CT	microtomografia computadorizada de alta resolução
<i>MMP 2 e 9</i>	Metaloproteinases de matriz 2 e 9
OC	Osteocalcina
<i>OPG</i>	Osteoprotegerina
<i>OPN</i>	Osteopontina
ORX	Grupo com cirurgia de orquiectomia
QR	Quantificação relativa
RA	Receptor de andrógeno
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa B
RANKL	Ligante do Receptor ativador do fator nuclear kappa B
RE	Receptor de estrógeno
ROI	Região de interesse
RT-PCR	PCR em tempo real
<i>RUNX2</i>	Fator de transcrição 2 da família <i>RUNX</i>
SHAM	Grupo com cirurgia fictícia

Tb. Sp. Diâmetro médio das cavidades que contém a medula óssea

Tb. Th. Espessura média das trabéculas

UNIFAL-MG Universidade Federal de Alfenas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	28
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	28
4.3	ANIMAIS	28
4.4	CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO E ALIMENTAÇÃO.....	29
4.5	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	29
4.6	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	30
4.6.1	Orquiectomia	30
4.6.2	Cirurgia SHAM	31
4.7	EUTANÁSIA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	32
4.8	ANÁLISE MORFOMÉTRICA POR MICRO CT.....	33
4.9	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	41
4.9.1	Extração de RNA	42
4.9.2	Síntese do DNA complementar (cDNA)	43
4.9.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) após Transcrição Reversa ou PCR em tempo real (RT-PCR)	43
4.9.4	Análise dos Resultados	44
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5	RESULTADOS	46
5.1	MEDIDAS CEFALOMÉTRICAS	46
5.2	VOLUME ÓSSEO, ANISOTROPIA E TRABECULADO DO CÔNDILO.....	49
5.3	VOLUME ÓSSEO, ANISOTROPIA E TRABECULADO DO PALATO	50
5.4	RESULTADO DA EXPRESSÃO GÊNICA.	51
6	DISCUSSÃO	53
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
	REFERÊNCIAS	59

ANEXO A – CERTIFICADO CEUA	67
---	-----------

1 INTRODUÇÃO

Na última década, o conhecimento da biologia óssea se expandiu com os avanços nas tecnologias de análises moleculares e avanços dos recursos de imagens por meio das tomografias (Chan; Tan, 2021; Fuller, H; Fuller, R; Pereira, 2015). Pesquisas envolvendo o genoma aceleraram em modelos animais, por meio de testes funcionais e estudos de doenças ósseas. As tecnologias transcriptômicas celulares e de linhagem celular *in vivo* transformaram nossa capacidade de identificar novas interações da via do fator de transcrição na osteogênese (Chan; Tan, 2021). Assim, sabendo que o crescimento craniofacial é um processo complexo e único, principalmente determinado pela genética do indivíduo e influenciado por fatores hormonais, é necessário utilizar novas tecnologias para esclarecer e elucidar seu processo (Bergamo *et al.*, 2022; Reis *et al.*, 2022). A testosterona é um importante hormônio e um destes fatores que afetam a formação e desenvolvimento ósseo craniofacial (Küchler *et al.*, 2021; Wei *et al.*, 2017).

Em adultos do sexo masculino, a testosterona é o andrógeno mais abundante presente na circulação sanguínea e a sua ausência acarreta maior efeito na inibição do crescimento craniofacial do que o estrógeno (Elzenaty; Du Toit; Flück, 2022; Tunheim *et al.*, 2023; Vanderschueren *et al.*, 2014). Desde a descoberta da testosterona como o principal andrógeno dos mamíferos em 1935 (David *et al.*, 1935), ela é alvo de pesquisa devido ao seu papel no desenvolvimento e funcionamento dos órgãos reprodutivos masculinos, manutenção da libido, remodelação da massa muscular e densidade óssea e aspectos relacionados a saúde cardiovascular (Handelsman, 2022).

No período da puberdade, condições genéticas e não genéticas podem baixar os níveis de testosterona (Salonia *et al.*, 2019). Em todo o mundo, calcula-se que 5,0% dos adolescentes do sexo masculino apresentam baixos níveis de testosterona (Zahra *et al.*, 2022). Existem estudos que investigaram a relação entre baixo nível de testosterona e morfologia facial (proporções faciais) em populações diversas, mas seus modelos de estudo foram diferentes e os resultados foram inconclusivos (Bird *et al.*, 2016; Hodges-Simeon *et al.*, 2016; Welker *et al.*, 2016).

Como a testosterona é produzida principalmente pelo testículo, muitas das alterações esqueléticas por deficiência de andrógenos podem ser reproduzidas por sua remoção (orquiectomia) em ratos (Turner *et al.*, 1989, 1990; Vandenput *et al.*, 2004). A orquiectomia é uma técnica comum e muito segura para avaliar a relação da supressão

da testosterona com fenótipos craniofaciais (Fujita *et al.*, 2006; Márquez Hernández *et al.*, 2011). Existem estudos onde os níveis de testosterona em animais foram suprimidos antes da puberdade e houve uma inibição no desenvolvimento de estruturas do complexo craniofacial (Fujita *et al.*, 2004, 2006; Reis *et al.*, 2022; Verdonck; De Ridder; Kühn; *et al.*, 1998). A testosterona atua na diferenciação de osteoclastos e osteoblastos no processo de crescimento sutural, endocondral e cartilaginoso (Fujita *et al.*, 2004; Verdonck; De Ridder; Kühn; *et al.*, 1998). Portanto, a inibição do crescimento ósseo e a perda de volume ósseo são alterações frequentemente associadas ao baixo nível de testosterona (Khosla; Monroe, 2018; Reis *et al.*, 2022).

A ação dos andrógenos sobre os ossos é mediada diretamente pelo Receptor de andrógeno (RA) ou indiretamente após conversão da testosterona em estradiol pela aromatase e ação no Receptor de estrógeno (RE) (Da Costa *et al.*, 2019). Estudos sugerem que os receptores estão diretamente envolvidos na regulação dos números de osteoclastos através de sinalizações ainda desconhecidas, o que os torna ainda uma área de pesquisa e investigação (Li *et al.*, 2009; Macari *et al.*, 2018; Omori *et al.*, 2020). A densidade mineral e óssea das porções trabecular e cortical do osso aparentemente é diretamente proporcional à manutenção pelos RA dos níveis sorológicos de testosterona disponíveis no sangue (Wu *et al.*, 2019; Yao *et al.*, 2021). O hormônio do crescimento (GH) e o Fator de Crescimento semelhante à Insulina tipo 1 (IGF-1) também estão envolvidos no crescimento ósseo e estão indiretamente relacionados com a testosterona (Handelsman, 2022; Welker *et al.*, 2016). Qualquer disfunção nos níveis desses hormônios pode promover uma desregulação neste processo de sinalização e alterar o crescimento e remodelação óssea (Tunheim *et al.*, 2023).

Diante do exposto, torna-se notório que células da região óssea sofrem influência da concentração de testosterona e que a sua deficiência poderia afetar a expressão de diversos outros genes relacionados a homeostase e formação óssea. Existem vários estudos de proteínas que atuam em células osteoblásticas e osteoclásticas, como *OC*, *OPN*, *RUNX2*, *MMP2* e *MMP9* (Chin; Ima-Nirwana, 2015; Komori, 2022; Si *et al.*, 2020; Wen *et al.*, 2022), mas nenhum trabalho relaciona como as concentrações destas proteínas podem ser afetadas pela desregulação da testosterona no desenvolvimento craniofacial. Através da PCR em tempo real (RT-PCR), é possível quantificar, compreender e investigar, no cenário da expressão gênica, os efeitos biomoleculares envolvidos nesse processo (Zucha *et al.*, 2021). E com isso explanar a respeito de

prováveis sinais mediados pelo RA para a manutenção do número de osteoclastos e osteoblastos no osso.

A osteocalcina (OC), a proteína não colágena mais numerosa da matriz óssea, é produzida especificamente pelos osteoblastos e inibe a formação e reabsorção óssea. Também funciona como um hormônio que regula o metabolismo da glicose no pâncreas, a síntese de testosterona nos testículos e massa muscular (Komori, 2020). A osteopontina (OPN), tem um papel importante na massa óssea e está envolvido na proliferação, migração e adesão de células-tronco mesenquimais da medula óssea, células-tronco hematopoiéticas, osteoclastos e osteoblastos (Si *et al.*, 2020). O *RUNX2*, é um fator de transcrição 2 que pertence à família *RUNX*, é expresso em condrócitos e células da linhagem osteoblástica. *RUNX2* é essencial para a maturação dos condrócitos e diferenciação de osteoblastos (Komori, 2022). As *MMPs 2 e 9*, são metaloproteinases de matriz que participam da regulação de processos de degradação/regeneração de matriz extra óssea (Tokuhara *et al.*, 2019). Exercem um papel não apenas para a viabilidade e funcionalidade dos osteoclastos, osteoblastos e osteócitos, mas também para a formação e desenvolvimento de condrócitos (Khoswanto, 2023).

Em um estudo prévio desenvolvido por Reis *et al.* (2022), exame radiográfico bidimensional foi usado para analisar o crescimento craniofacial de ratos machos, demonstrando que a ausência da testosterona diminui as medidas cefalométricas do crânio, maxila e mandíbula. Foram observadas variações nas medidas angulares nos grupos orquiectomizados, sugerindo que as estruturas cranianas são diferentemente reguladas pela testosterona. Entretanto, este tipo de exame radiográfico apresenta limitações e distorções, por isso é necessário consolidar estes achados por meio de um exame com maior precisão. No presente estudo a microtomografia computadorizada de alta resolução (micro CT) foi utilizada para obter medidas lineares e volumétricas do crânio de animais submetidos à orquiectomia.

Derivada da Tomografia Computadorizada, a micro CT é capaz de produzir imagens em alta resolução de pequenas amostras. Essa técnica possibilita a reconstrução de imagens tridimensionais, que são formadas pela união digital de centenas de seções transversais do material avaliado (Baird; Taylor, 2017). É amplamente utilizada em pesquisas biomédicas e é considerada a técnica de avaliação “padrão ouro” para o estudo de amostras de tecidos mineralizados, como ossos e dentes (Queiroz *et al.*, 2019). Portanto, é o método ideal para avaliação experimental

da arquitetura óssea e morfologia estrutural sob diversas condições patológicas (Sherrier *et al.*, 2022).

Há muitas pesquisas disponíveis sobre os efeitos da testosterona na literatura médica, relacionando-a à osteoporose, diabetes e hipogonadismo. Porém, há poucos estudos na área odontológica. Elucidar os efeitos da testosterona durante o crescimento craniofacial é essencial para avaliar as tendências de normalidade ou diagnosticar alterações no crescimento. Para o profissional Odontólogo, estas informações são cruciais para tomar as decisões de tratamento ortodôntico e alcançar com sucesso o melhor resultado para o paciente com deficiência de produção deste hormônio.

Neste contexto, este estudo pretende reforçar, com melhor exatidão e clareza, o quanto a supressão da testosterona influencia o crescimento do complexo craniofacial, por meio de medidas lineares, angulares, obtidas em imagens micro tomográficas. Bem como, quantificar as estruturas ósseas, quanto ao volume, densidade e direção de crescimento trabecular dos animais submetidos à supressão de testosterona. Os mecanismos biomoleculares envolvidos nesse processo também precisam ser investigados, e assim, neste trabalho, através da técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) demonstrar o quanto os efeitos biomoleculares da supressão de testosterona afetam os níveis de *OC*, *OPN*, *RUNK2*, *MMP2* e *MMP9* em células ósseas nas regiões de sutura palatina, região retro molar e côndilo. Suas conclusões permitirão consolidar bases científicas para o profissional ortodontista intervir precocemente e com isso minimizar as consequências da ausência deste hormônio sobre o sistema estomatognático.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Junto com fatores ambientais, nutricionais e genéticos, os hormônios sexuais regulam o crescimento, desenvolvimento e maturação esquelética, e o impacto da insuficiência destes hormônios na integridade esquelética tem sido amplamente reconhecido (Lara-Castillo, 2021; Perry *et al.*, 2008; Tunheim *et al.*, 2023). Estudos anteriores mostram que a administração de testosterona aumenta, diretamente, a largura da placa de crescimento epifisário de ratos (Phillip *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 1989; Zung *et al.*, 1999). A testosterona possui efeitos androgênicos e anabólicos, tanto em mulheres quanto em homens, mas os homens produzem significativamente mais testosterona do que as mulheres. E a concentração durante a puberdade é 20 a 30 vezes maior nos homens do que nas mulheres (Whitehouse *et al.*, 2015) e na idade adulta a concentração de testosterona circulante em homens se mantêm 15-20 vezes maior do que em mulheres (Handelsman, 2022).

No homem, 95% deste hormônio testosterona é secretado pelos testículos e 5% são produzidos pelas suprarrenais pela conversão de dehidroepiandrosterona (Vanderschueren *et al.*, 2014). A regulação da produção é feita pelo sistema endócrino, que também é o responsável pela produção de diversos hormônios que regulam o crescimento e funções do corpo humano (Tunheim *et al.*, 2023). Hormônios do crescimento, hormônios tireoidianos e esteroides sexuais exercem diversas influências no esqueleto. Durante o crescimento eles influenciam no tamanho e forma, durante a vida adulta na remodelação óssea e contribuem para sua homeostase. Por isso, as quantidades dos hormônios sexuais são de fundamental importância no crescimento da face, base do crânio e também na erupção dos dentes (Cray *et al.*, 2011; Premkumar; Gurumurthy, 2013).

Via mecanismo de feedback, a produção de andrógenos é controlada, no sistema endócrino, pela liberação pulsátil do hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofina (GnRH). Seu órgão alvo é a glândula hipófise anterior, que responde a cada pulso de GnRH, produzindo hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) e os libera na circulação geral. O FSH estimula as células de Sertoli para apoiar a espermatogênese e secretar inibina B, que regula negativamente a secreção de FSH. As células de Leydig dos testículos respondem ao LH produzindo testosterona e são liberadas na corrente sanguínea e posteriormente transportadas para células-alvo específicas, onde seus efeitos são exercidos. A testosterona estimula

a produção de esperma e a virilização, além de fornecer feedback ao hipotálamo e hipófise para regular a secreção de GnRH via mecanismo de feedback negativo (Mohamad *et al.*, 2016; Tunheim *et al.*, 2023).

Além da ação da testosterona produzida pelos testículos, certos tecidos, incluindo a glândula prostática, pele, folículos pilosos, fígado e cérebro, convertem localmente a testosterona num andrógeno endógeno mais potente, a dihidrotestosterona (DHT), por ação da enzima 5 α redutase (Handelsman, 2022). Esta fórmula tem cerca de 5 a 10 vezes maior afinidade pelos RA de algumas células como musculares, cerebrais e ósseas em comparação com a testosterona (Handelsman, 2022; Naamneh Elzenaty *et al.*, 2022). Por outro lado, andrógenos produzidos na suprarrenal também são importantes precursores do hormônio estrogênio, isso faz com que as mulheres produzam primeiro hormônios masculinos para, depois, transformá-los em hormônios femininos (Wolff *et al.*, 2012). Por isso, de forma direta ou indireta, autores afirmam que a testosterona estimula a diferenciação e proliferação de osteoclastos, osteoblastos e condroblastos por meio de RA em células indiferenciadas e maduras durante os processos de crescimento sutural e endocondral (Hentz; Nogueira, 2023; Zhang *et al.*, 2016; Reis *et al.* 2022). Contudo, o mecanismo específico de ação da testosterona em cada célula, região óssea e tipo de crescimento permanece em investigação (Fujita *et al.*, 2006; Verdonck; De Ridder; Kühn; *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2019).

Assim, devido sua influência sobre o aparecimento e o desenvolvimento dos centros de ossificação, alguns estudos demonstraram que as medidas craniofaciais estão correlacionadas com os níveis de testosterona em homens (Verdonck *et al.*, 1999; Lefevre *et al.*, 2013; Whitehouse *et al.*, 2015). Com a sua diminuição, a atividade osteoclástica é maior do que a osteoblástica, reduzindo potencialmente a formação óssea (Wolff *et al.*, 2012). Entretanto, outros estudos apontam discrepâncias nesta correlação, sugerindo que análises mais complexas e que compreendam o crânio como um todo sejam realizadas, justificando-se pelo fato de que as diversas estruturas do complexo craniofacial respondem de modos diferentes ao estímulo da testosterona (Bird *et al.*, 2016; Green *et al.*, 2019). Além disso, as estruturas de crescimento craniofacial também reagem de modo diferente conforme o momento em que o indivíduo é exposto aos baixos níveis de testosterona (Verdonck; De Ridder; Verbeke; *et al.*, 1998; Whitehouse *et al.*, 2015).

Existem dois tipos de crescimento ósseo no complexo craniofacial:

intramembranoso e endocondral (Manlove;Romeo;Venugopalan,2020). Primeiramente para formação óssea, nos dois tipos de crescimento, há concentração de células mesenquimais em locais onde os futuros ossos se desenvolverão. Na ossificação intramembranosa, as células mesenquimais se diferenciam diretamente em células formadoras de osso, osteoblastos, sem a presença de um tecido cartilaginoso precursor. Este tipo, ocorre na maioria dos ossos faciais, em ossos planos do crânio e da mandíbula (Hentz; Nogueira, 2023). No tipo endocondral, as células mesenquimais se diferenciam em condrócitos para formar uma cartilagem modelo. Após a formação de osteoblastos, a cartilagem é substituída por tecidos ósseos mineralizados, o que ocorre no côndilo mandibular, na sincondrose mandibular e base do crânio (Hentz; Nogueira,2023; Zhang *et al.*, 2016). Os trabalhos de Fujita *et al.* (2006) e Verdonck; De Ridder; Verbeke *et al.* (1998) demonstraram que o crescimento intramembranoso parece ser mais afetado pela supressão de testosterona do que o crescimento endocondral. O crescimento mandibular é dependente da ossificação endocondral e medular (Kang *et al.*, 2015). Por outro lado, o crescimento e desenvolvimento da maxila, que é estritamente intramembranoso, depende do crescimento sutural do complexo craniofacial (Trevizan *et al.*, 2018).

Por apresentarem fisiologia semelhante à humana, os ratos e camundongos são um modelo animal muito utilizado em estudos de metabolismo ósseo (Schafrum Macedo; Cezaretti Feitosa, 2019). Por meio da supressão hormonal , estudos em animais permitem inferir sobre o papel do hormônio no crescimento e desenvolvimento ósseo humano (Mohamad *et al.*, 2016). As principais características de alterações ósseas associadas à deficiência de esteroides sexuais em humanos podem ser reproduzidas em ratos e camundongos por orquiectomia (Li *et al.*, 2009; Manolagas *et al.*, 2002).

Considerado o método “padrão ouro” para realizar a supressão da testosterona, a orquiectomia é a remoção bilateral de testículos e epidídimos (Jopek *et al.*, 2017; Verdonck; De Ridder; Verbeke *et al.*, 1998). O hormônio testosterona tem seu pico máximo de influência durante a puberdade, o que justifica estudos realizarem orquiectomia em ratos machos antes da puberdade, e, posteriormente, avaliem o impacto da supressão da testosterona, através da mensuração das dimensões mandibular, maxilar, craniana e principais centros de crescimento facial (Reis *et al.*, 2022).

Para avaliar o efeito da testosterona no crescimento ósseo, a microtomografia

computadorizada (micro CT) é uma técnica de excelência, pois permite analisar e mensurar a morfologia e microarquitetura de ossos de pequenos animais (Bouxsein *et al.*, 2010). É uma técnica de imagem que permite a obtenção de imagens bidimensionais e tridimensionais de pequenas amostras, além de quantificações automatizadas de área e volume de sua estrutura. O exame micro tomográfico utiliza a atenuação de raios X para a formação das imagens e possui os mesmos princípios físicos da Tomografia Computadorizada (Queiroz *et al.*, 2019).

Como vantagens da micro CT estão medidas quantitativas precisas, baixo coeficiente de variação e avaliação não deletéria da morfologia óssea interna e externa (Umoh *et al.*, 2009). Possui limitações significativas em comparação ao estudo histomorfométrico, pois não tem possibilidade de analisar a morfologia, multiplicação e diferenciação celular, microcirculação e vascularização no interior do osso. No entanto, fornece dados de imagem altamente informativos e precisos para análises morfométricas quantitativas em três dimensões da estrutura óssea (Cuijpers *et al.*, 2014; Fajardo *et al.*, 2002; Kustro *et al.*, 2018).

A construção de toda arquitetura óssea depende da ativação de fatores de transcrição osteogênica. A sua expressão é regulada em vários níveis celulares, sendo que um equilíbrio requer interações moleculares que funcionam para ativar ou suprimir a expressão genética específica, bem como epigenética, controles hormonais e fatores ambientais (Salhotra *et al.*, 2020). Uma desregulação de fatores e cofatores de transcrição pode levar a deformidades ósseas e distúrbios da massa óssea. Por outro lado, mecanismos de modulação destes fatores podem fornecer soluções para o tratamento de doenças ósseas (Chan; Tan, 2021). Não há estudos *in vivo* sobre alterações na expressão de genes das proteínas *OC*, *OPN*, *RUNK2*, *MMP2* e *MMP9* relacionados ao crescimento ósseo craniofacial em ratos orquiectomizados.

Os osteoblastos produzem osteocalcina (*OC*), que é a proteína não colágena mais abundante no osso (Komori, 2020). A *OC* na matriz óssea é parcialmente descarboxilada em *OC* subcarboxilato e liberada na corrente sanguínea e, assim, regula o metabolismo da glicose no pâncreas, a síntese de testosterona nos testículos e massa muscular (De Toni *et al.*, 2017). No osso tem função na qualidade do crescimento, já que alinha a apatita biológica paralelamente às fibrilas de colágeno e, assim, melhora a resistência mecânica por meio da distribuição da carga ao longo do osso (Komori, 2020).

Outra proteína importante para o desenvolvimento ósseo é a osteopontina

(*OPN*). Ela está relacionada à proliferação, migração e adesão de células-tronco mesenquimais da medula óssea, osteoclastos e osteoblastos (Si *et al.*, 2020). Foi demonstrado que a *OPN* é um regulador chave para a ocorrência e desenvolvimento de muitas doenças relacionadas aos ossos, como osteoporose, artrite reumatoide e osteossarcoma (Bouleftour *et al.*, 2019). Como esperado, as funções da *OPN* no osso tornaram-se um ponto importante de pesquisa, de forma que em sua revisão de literatura Vancea *et al.* (2021) concluíram que o nível sérico de *OPN* pode ser utilizado para detecção de riscos de fratura óssea.

O *RUNX2* é um fator de transcrição fundamental na ossificação endocondral. O *RUNX2* induz a maturação e aumenta a proliferação de condrócitos e induz a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (Komori, 2022). Mutações de *RUNX2* resultam em displasia cleidocraniana, caracterizada por atraso no fechamento sutural, hipoplasia das clavículas, tórax em forma de funil, presença de múltiplos dentes impactados, juntamente com a presença de outros defeitos esqueléticos (Marya *et al.*, 2022). A ausência do *RUNX2* causa insuficiência respiratória, a má formação óssea e conseqüentemente morte em camundongos (Lim *et al.*, 2015). O aumento da sua expressão também causa alteração óssea, como a osteopenia (Kanatani *et al.*, 2006).

As metaloproteinases de matriz (*MMPs*) são proteínas que clivam componentes da matriz extracelular, permitindo uma dinâmica deposição e decomposição (Jiang *et al.*, 2020). Por isso, são mediadores fundamentais da fisiologia óssea, e em condições fisiológicas e patológicas, têm um papel de permitir a viabilidade e funcionalidade dos osteoclastos, osteoblastos, osteócitos e também para a formação e desenvolvimento de condrócitos, todos afetados pela degradação da matriz óssea (Khoswanto, 2023). Quando certas moléculas, como *MMPs* 2 e 9, não estão presentes durante o desenvolvimento esquelético, surgem defeitos graves nas placas ósseas longas, impedindo a formação óssea normal (Tokuhara *et al.*, 2019).

Dessa forma, pela análise microtomográfica será possível fornecer evidências quanto ao crescimento e a densidade mineral do osso trabecular e condilar da maxila e mandíbula dos animais com supressão de testosterona. Além disso, por meio da análise de *OC*, *OPN*, *RUNX2*, *MMP2* e *MMP9* por PCR em tempo real será possível inferir sobre os efeitos biomoleculares da supressão de testosterona em células ósseas. Essas análises permitirão discorrer quanto à susceptibilidade dos indivíduos com carência de andrógeno de sofrerem fraturas ósseas, osteoporose, perda dentária, diminuição do rebordo alveolar e quaisquer patologias dependentes do metabolismo

ósseo para o reparo, além das tendências de crescimento, formação e remodelação óssea essenciais para o sucesso do tratamento ortodôntico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar as diferenças do crescimento e desenvolvimento craniofacial entre animais submetidos à supressão de testosterona na puberdade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar as medidas lineares e angulares dos crânios dos grupos controle e orquiectomizados por meio de microtomografia computadorizada;
- b) Avaliar os padrões qualitativos e quantitativos do osso da maxila e mandíbula dos grupos controle e orquiectomizados por meio de microtomografia computadorizada;
- c) Comparar o padrão de desenvolvimento ósseo dos animais com supressão de testosterona e os do grupo controle;
- d) Avaliar a diferença na expressão gênica de biomarcadores (*OC*, *OPN*, *RUNK2*, *MMP2* e *MMP9*) relacionados a formação e manutenção óssea, através do método de PCR em tempo real em animais normais e orquiectomizados;

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais relacionados aos animais foram detalhados em estudo anterior (REIS *et al.*, 2022). Nenhum novo procedimento animal foi conduzido no presente estudo.

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Os procedimentos envolvendo modelo animal foram previamente submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas, que aprovou este projeto sob número de protocolo 024/2019 conforme anexo (ANEXO A).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O cálculo de tamanho de amostra para comparação de uma hipótese em dois grupos ou mais (Miot, 2011) foi realizado utilizando-se os parâmetros de desvio padrão da diferença dos pares e média da diferença entre os pares do estudo de OMORI *et al.* (2020) que avaliou o papel do estrógeno no desenvolvimento craniofacial. Os resultados significativos desse estudo permitiram obter o valor de 0,89 para o desvio padrão e 0,63 para a média, levando à um valor de 7 animais por grupo.

Aproximadamente 20% dos animais poderiam vir a óbito após a orquiectomia (Idris, 2012; Pritchett-Corning *et al.*, 2011), devido a hipotermia e infecções decorrentes da cirurgia. Por isso, foi necessário acrescentar mais dois animais por grupo, totalizando 9 animais por grupo (n=36).

4.3 ANIMAIS

Para o estudo, foram selecionados *Rattus norvegicus* machos da linhagem *Wistar* heterogêneos. Espécie bem aceita em pesquisas ósseas devido ao seu nível de proximidade com a fisiologia humana (Bergamo *et al.*, 2022; Cezaretti Feitosa, 2019; Gibbs *et al.*, 2004; Küchler *et al.*, 2021; Schafrum Macedo;). Os animais foram obtidos no Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) no dia do desmame (21 dias), com um peso médio de 78,86 gramas e Desvio Padrão (DP) de 11,26. Em seguida, os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de

Anatomia da UNIFAL-MG.

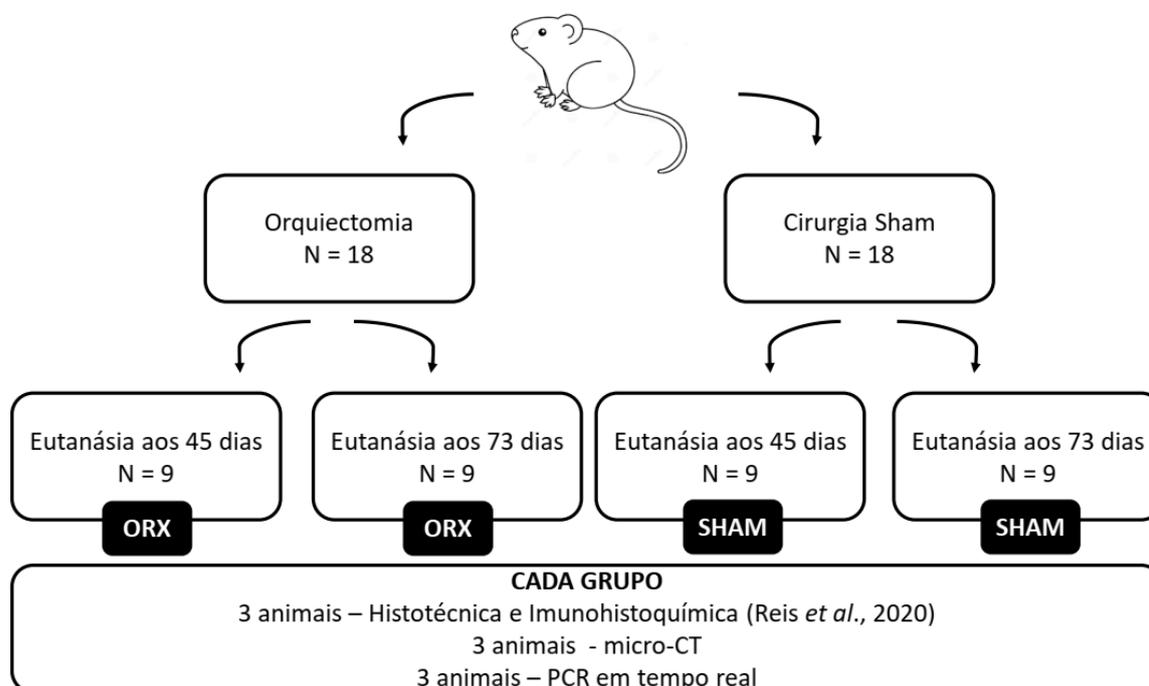
4.4 CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO E ALIMENTAÇÃO

Para alojamento dos animais, foram usadas caixas de polipropileno de dimensões de 49x34x16cm forradas com maravalha. A distribuição foi de três ratos por caixa, mantidos com acesso livre à ração e água filtrada. Os animais não foram aleatoriamente alojados para evitar lesões por mordedura até a divisão em grupos experimentais (Brown, 1986; Koolhaas, 2010). Os animais foram mantidos sob condições ambientais controladas, ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de 21° a 23° Celsius com exaustão do ar.

4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

De forma aleatória, trinta e seis animais foram alocados por um pesquisador em 4 grupos, sendo 2 grupos experimentais e 2 grupos controle (FIGURA 1). Aos 23 dias de vida, foram realizadas as cirurgias de Orquiectomia e fictícia (SHAM), no grupo experimental e no grupo controle respectivamente. As cirurgias fictícias foram realizadas para fins de ajuste dos seguintes fatores de confusão: anestesia, estresse cirúrgico, síntese de tecidos moles e utilização de analgésico. Aos 45 dias foram eutanasiados um grupo experimental e um grupo controle e aos 73 dias os outros dois grupos restantes.

Figura 1 - Fluxograma de alocação de animais



Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

4.6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A orquiectomia foi o procedimento usado para supressão da testosterona, por ser o método mais seguro e eficaz para este tipo de estudo em animais. Ela consiste na remoção dos testículos e epidídimos, o que afeta diretamente os níveis sorológicos desse hormônio durante a puberdade (Fujita *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2009; Mohamad *et al.*, 2016; Verdonck;De Ridder;Kühn; *et al.*, 1998; Verdonck;De Ridder;Verbeke; *et al.*, 1998). Como mencionado acima, o grupo controle recebeu uma cirurgia fictícia (SHAM). Um único operador previamente treinado por veterinária e que não participou do processo de alocação dos animais realizou os procedimentos cirúrgicos.

4.6.1 Orquiectomia

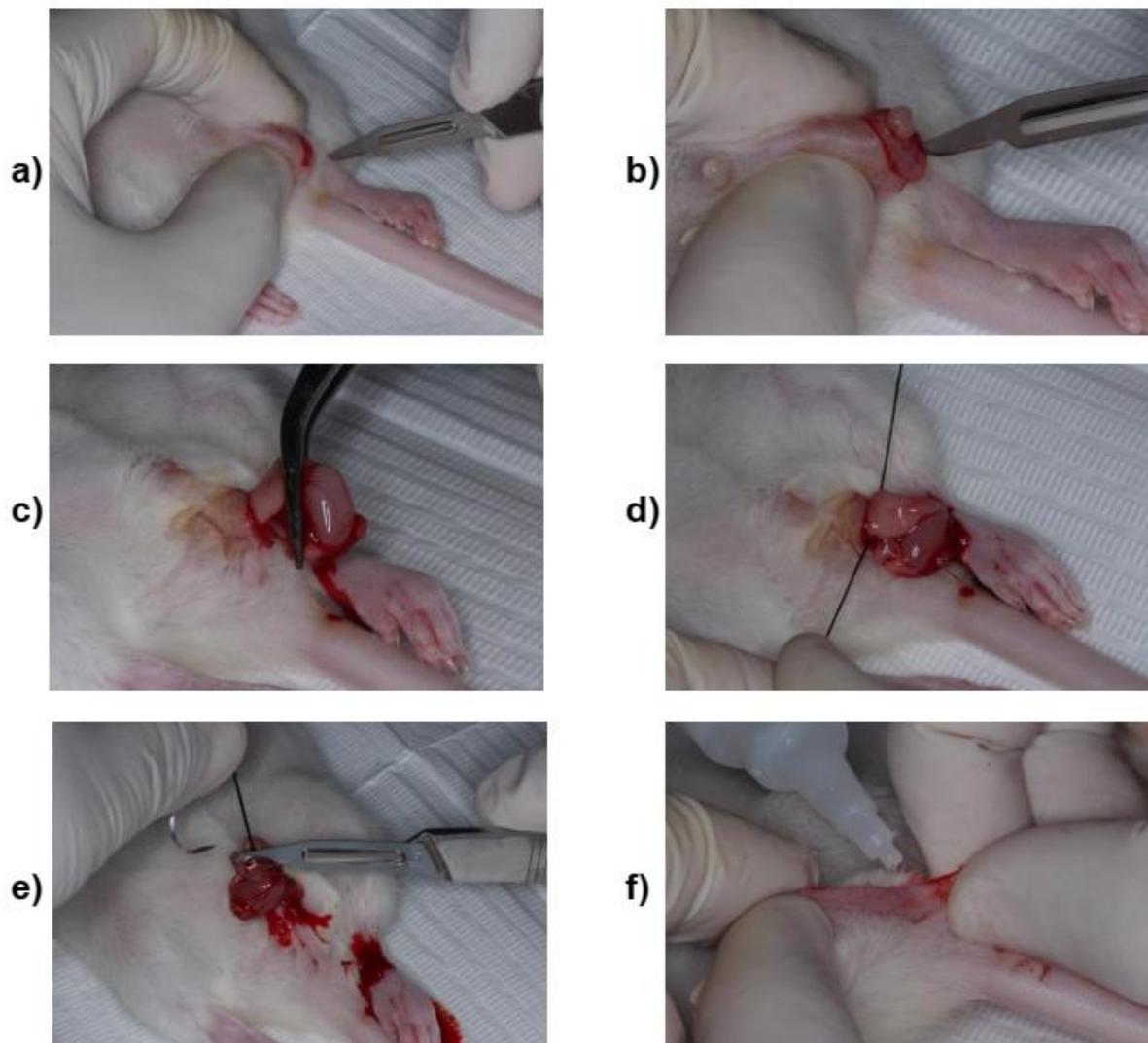
A orquiectomia foi realizada no 23º dia de vida do animal, data escolhida depois da descida dos testículos, que ocorre próximo ao 15º dia de vida, e antes do 26º dia de vida, data esta que já inicia discreta produção de testosterona antes da puberdade, que

ocorre à partir do 35º dia (Lee *et al.*, 1975; Otto *et al.*, 2015). Os animais foram submetidos à anestesia por meio de injeção intraperitoneal com Cloridrato de Ketamina 10% (55 mg/Kg de peso corporal) e Xilazina 2% (5 mg/Kg de peso corporal). Seguindo o protocolo de Idris (2012), primeiramente, limpeza e antissepsia da região cirúrgica foi realizada com solução de PVPI 10%. Os testículos foram expostos após uma incisão em cada lado do escroto utilizando lâmina de bisturi. Foi realizada ligadura das estruturas do funículo espermático com um fio de seda 4.0 mm, antes da remoção cirúrgica dos testículos e epidídimo. O restante do conteúdo escrotal foi reinserido no escroto e a síntese dos tecidos moles foi realizada com adesivo a base de cianoacrilato (Figura 2). Após a cirurgia, os animais foram medicados com cloridrato de Tramadol (12,5 mg/kg intramuscular) para analgesia pós-cirúrgica, de 12h/12h, por um dia. Os ratos foram observados durante 12 horas após a cirurgia para a reversão de hipotermia e pronto atendimento de qualquer complicação pós-cirúrgica. Todos os procedimentos de manuseio dos animais e experimentais, as medicações e posologias seguiram as diretrizes do Guia de Procedimentos e de Doses em Roedores de Laboratório da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIFAL/MG (Garcia, 2021).

4.6.2 Cirurgia SHAM

Uma cirurgia fictícia (SHAM) foi feita nos animais do grupo controle, seguindo os mesmos passos operatórios e técnicas para incisão e síntese dos tecidos, bem como a reprodução da anestesia e analgesia. Entretanto, neste caso os testículos foram somente movimentados e colocados intactos na posição original.

Figura 2 – Sequência da orquiectomia.



Fonte: adaptado de Reis, (2022).

Legenda: a) Incisão.

b) Exposição do testículo.

c) Extravasamento do conteúdo escrotal.

d) Ligadura do funículo espermático.

e) Excisão do testículo e epidídimo.

f) Síntese do tecido mole.

4.7 EUTANÁSIA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Os procedimentos de eutanásia foram realizados de acordo com as diretrizes do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), 2018. A

eutanásia foi realizada em um grupo experimental e um controle no 45º dia de vida, para avaliar o crescimento ósseo na metade da puberdade. No 73º dia de vida, os dois grupos restantes foram eutanasiados para avaliar o crescimento ósseo no fim da puberdade (Otto *et al.*, 2015). Para o procedimento, os animais foram mortos por overdose de inalação de isoflurano (31% a 760mm Hg). A morte do animal foi confirmada após a interrupção dos movimentos respiratórios e musculares.

Dos 9 animais de cada grupo experimental, 3 foram destinados a análise histotécnica e imunohistoquímica (Reis *et al.*, 2022), 3 foram destinados à análise microtomográfica e 3 foram destinados para análise de RT-PCR. Os animais tiveram suas cabeças removidas com guilhotina após a constatação da morte. Para a análise microtomográfica, os crânios foram fixados por imersão em formol tamponado a 10% por 24 horas e armazenados em formol até o escaneamento. Os crânios, para RT-PCR, dos diferentes grupos, foram armazenados em tubos plásticos livres de RNAses, identificados e armazenado congelado em Freezer -80°C, até o momento de ser processado para extração e quantificação do DNA.

4.8 ANÁLISE MORFOMÉTRICA POR MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

As amostras foram escaneadas em colaboração com o Laboratório de Pesquisa em Endodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, por meio de um micro tomógrafo 1174 v.2 (SkyScan, Kontich, Bélgica), fonte de 100 kV e campo de visão de 50 mm (FOV), com um manipulador de precisão e um detector baseado em uma câmera CCD de 11 Mp. A aquisição das imagens foi realizada conforme parâmetro de rotação de 360°, passo de rotação 0.7, e tamanho de voxel isotrópico de 31,8 µm. O tempo médio de escaneamento para cada crânio foi de 65 minutos. As projeções bidimensionais foram arquivadas no formato *Digital Imaging and Communications in Medicine* (DICOM).

As imagens foram reconstruídas e mensuradas utilizando o software Inobitec DICOM Viewer PRO v2.11 (INOHITEC LLC - RÚSSIA - FEDERAÇÃO RUSSA). Para realizar as medidas morfométricas maxilar e mandibular, as imagens 3D foram alinhadas de forma padronizada em todos os ratos, em vista dorsal, lateral, frontal e ventral, como orienta Küchler *et al.* (2021). Os pontos morfométricos nas imagens tridimensionais (Tabela 1) que foram utilizados para as mensurações esqueléticas foram selecionados com base em Corte *et al.* (2019), Fujita *et al.* (2004), Küchler *et al.*

(2021), Perillo *et al.* (2014), Wang *et al.* (2016) e Wei *et al.* (2017). Um único examinador calibrado (ICC = 0,992) realizou cegamente todas as análises morfométricas. Cada medição foi feita três vezes e a média das três medições foi utilizada para realizar análise estatística.

Tabela 1 – Pontos de referência para medidas lineares e angulares

(continua)

Pontos	Descrição
1	Nasale: Intersecção dos ossos nasais, ponto rostral.
2	Násio: Intersecção dos ossos nasais, ponto caudal.
3	Bregma: Intersecção dos ossos frontais e ossos parietais na linha média.
4	Intersecção dos ossos parietais com a face anterior do osso interparietal na linha média.
5	Raiz zigomática conectando o corpo escamoso.
6	Intersecção frontal-escamosa na crista temporal.
7	Intersecção superior e lateral do processo zigomático e arco zigomático.
8	Incisura anterior no processo zigomático.
9	Ponto de margem externa no osso nasal.
10	Ponto mais anterior do alvéolo do incisivo superior.
11	Intersecção do osso maxilar e pré-maxilar no plano sagital médio.
12	Ponto mais caudal do osso palatino no plano sagital médio.
13	Ponto mais ventral do Interesfenóide sicondrose no plano sagital médio.
14	Extremidade rostral do osso pré-esfenóide no plano sagital médio.
15	O ponto mais lateral do orifício orbital.
16	O ponto mais lateral da face orbital.
17	O ponto lateral mais proeminente na superfície vestibular do primeiro molar superior.
18	Ponto localizado na profundidade da concavidade do contorno lateral da maxila, na junção da maxila e do suporte zigomático.
19	A ponto na concavidade mais profunda da linha média da maxila entre a espinha nasal anterior e o próstio.
20	O ponto localizado no pólo lateral da cabeça condilar.
21	O ponto localizado no ângulo goníaco da mandíbula
22	O ponto localizado na incisura antegonial
23	O ponto mais inferior da sínfise mandibular no plano sagital médio
24	Forame mental anterior proeminente
25	O ponto mais superior do processo condilar direito
26	Ponto mais posterior do côndilo
27	Ponta do ângulo mandibular
28	Ponto no contorno mais inferior do processo angular da mandíbula

Tabela 1 – Pontos de referência para medidas lineares e angulares

(conclusão)

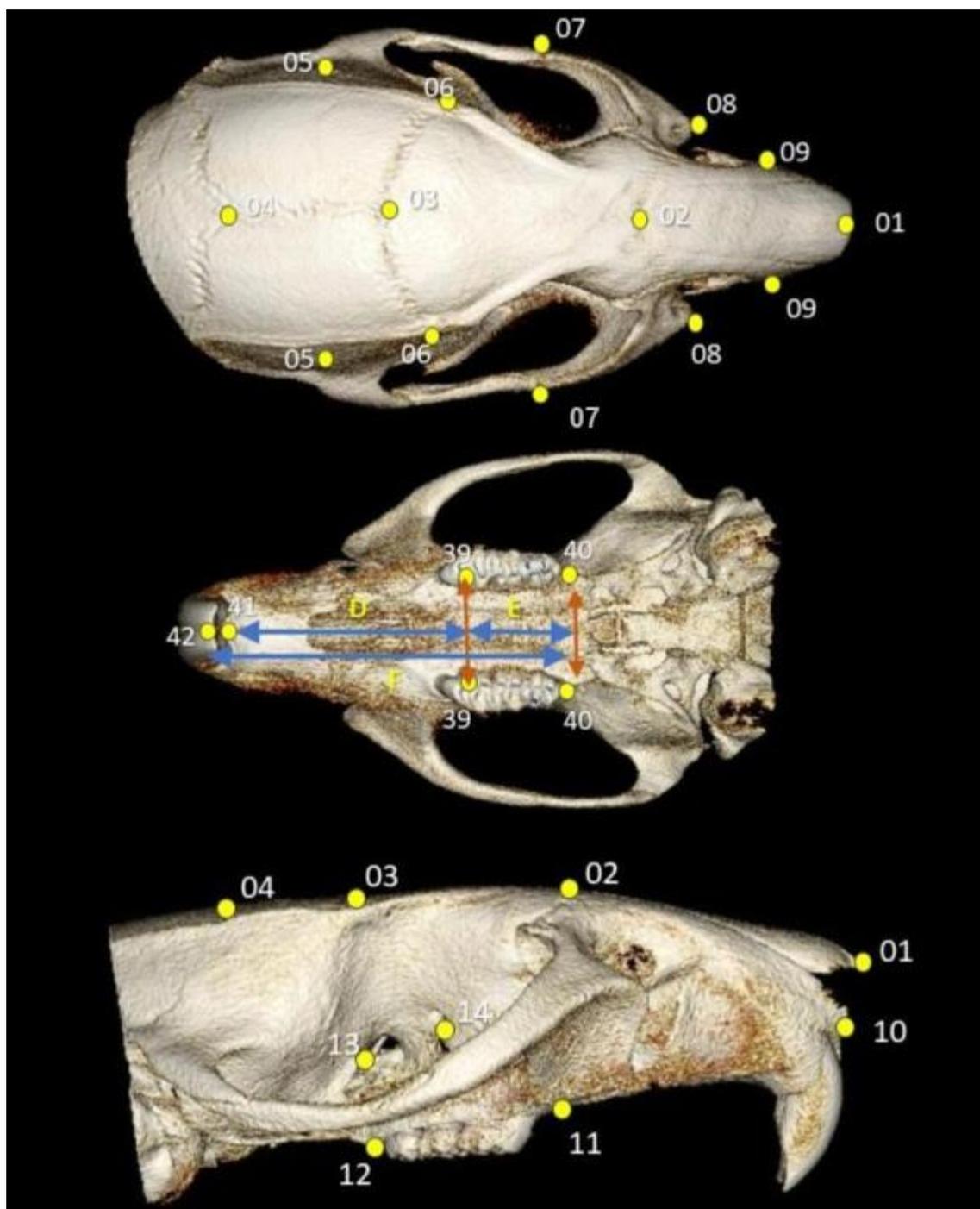
Pontos	Descrição
29	Ponto inferior na sínfise mandibular
30	Ponto da borda inferior no alvéolo incisivo inferior (junção osso-dente)
31	Ponto mais proeminente entre as bordas incisais do incisivo inferior
32	Ponto da borda superior no alvéolo incisivo inferior (junção osso-dente)
33	Ponto na intersecção entre o osso alveolar mandibular e a superfície mesial do primeiro molar
34	Incisuras sigmoides.
35	Ponto mais superior do processo coronóide.
36	Ponto médio do diastema.
37	Cúspide mesial 1º molar inferior.
38	Processo alveolar distal ao último molar inferior.
39	Cúspide mesial 1º molar superior.
40	Processo alveolar distal ao último molar superior.
41	Ponto da borda inferior no alvéolo incisivo superior (junção osso-dente).
42	Ponto mais proeminente entre as bordas incisais do incisivo superior.

Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

Nas figuras 3 e 4 mostram os pontos nas imagens utilizados para as mensurações. As tabelas 2 e 3 demonstram as medidas lineares e ângulos utilizados para as comparações dos grupos.

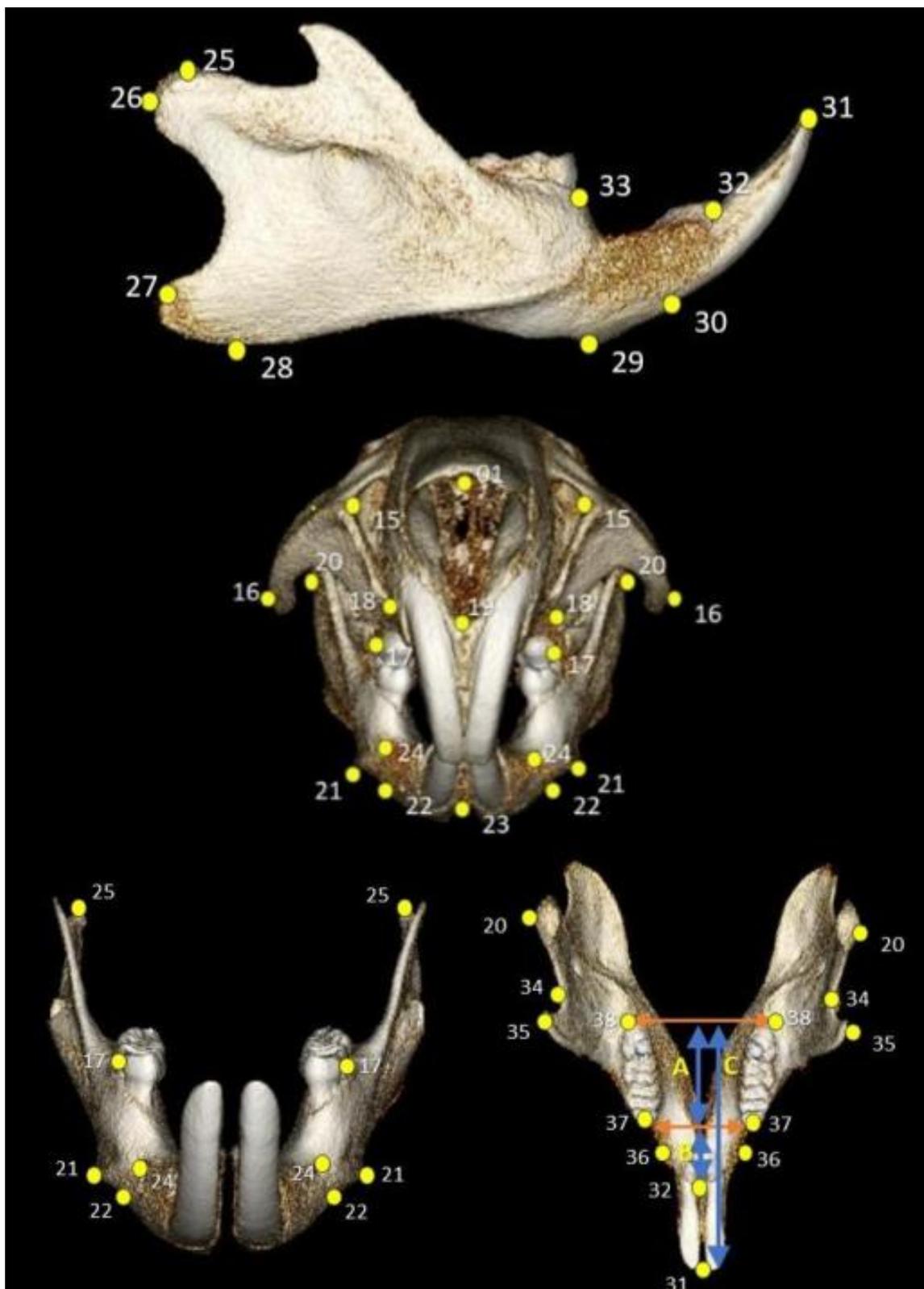
Posteriormente, para análise qualitativa da estrutura óssea do côndilo mandibular e da região do osso palatino foi feita a segmentação da área de interesse na microtomografia com o software Inobitec® DICOM Viewer. A referência para o corte da imagem do côndilo foi o ponto mais côncavo da incisura mandibular e o ponto mais anterior do ramo da mandíbula (Figura 5). Na região palatina foi segmentado no sentido anteroposterior da mesial dos primeiros molares até a distal dos terceiros molares, e no sentido transversal, uma linha perpendicular aos traçados anteriores, cruzando os pontos mais convexo dos forames incisivos (Figura 6).

Figura 3 – Pontos de referência para análise micro tomográfica do crânio.



Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

Figura 4 – Pontos de referência para análise micro tomográfica frontal do crânio e mandíbula.



Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

Tabela 2 - Medidas lineares e ângulos do crânio.

Linear	Descrição	Linear	Descrição
1-2	Comprimento do osso nasal	1-22	-
2-3	Comprimento do osso frontal	1-16	-
3-4	Comprimento do osso parietal	15-15	-
1-12	Comprimento facial	16-16	-
2-14	Comprimento anterior da base do crânio	20-20	-
2-11	Altura facial	17-17	-
3-13	Altura craniana anterior	18-18	-
4-13	Craniana media	40 – 40	Largura do arco
2-7	-	39 - 39	Distância inter molar
3-9	-	F	Comprimento do arco
3-7	-	E	Comprimento do segmento posterior
9(L) – 9(R)	Largura nasal	D	Comprimento do diastema
8(L) – 8(R)	Largura zigomática anterior (Facial)		
7(L) – 7(R):	Largura interzigomática		
6(L)–6(R):	Largura frontal		
5(L)-5(R)	Largura interparietal		
1-23	Plano médio sagital		
19-23	Plano médio sagital (terceiro médio)		
18-22	Planos dentários frontais		
Ângulo	Descrição		
13-2-3	Ângulo rostral da cavidade craniana		
2-3-4	Ângulo médio anterior da abóbada craniana		
12-2-1	Ângulo “snout”		
13-2-10	Ângulo crânio-maxila		

Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

Nota: As medidas com o campo "Descrição" vazias não foram nomeadas pelos autores que as idealizaram.

Tabela 3 - Medidas lineares e ângulos mandibulares

Linear	Descrição	Linear	Descrição
25R-25L	Largura mandibular	32-31	-
21 -21	Distância dos ângulos goníacos da mandíbula	28-25	-
22 -22	Distância entre pontos localizados na incisura antegonial	20(R)-20(L)	Distância intercondilar
17 – 17	Distância entre os pontos laterais mais proeminente na superfície vestibular do primeiro molar inferior	35(R)-35(L)	Distância intercoronoidal
24 - 24	Distância entre os forames mentais anteriores	34(R)-34(L)	Largura entre as incisuras sigmóides
26-27	Altura mandibular	36(r)-36(l)	Distancia interdiastemal
26-32	Superior mandibular	38(r)-38(l)	Largura do arco
27-29	Altura mandibular inferior	37(r)-37(l)	Distância intermolar
27-25	-	C	Comprimento do arco
29-28	-	A	Comprimento do segmento posterior
29-25	-	B	Comprimento do diastema
30-31	-	32-31	-
32-33	-	28-25	-
Ângulo	Descrição	Ângulo	Descrição
28-29-31	-	31-27-32	Ângulo Maxila-Mandíbula
25-28-29	-		

Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

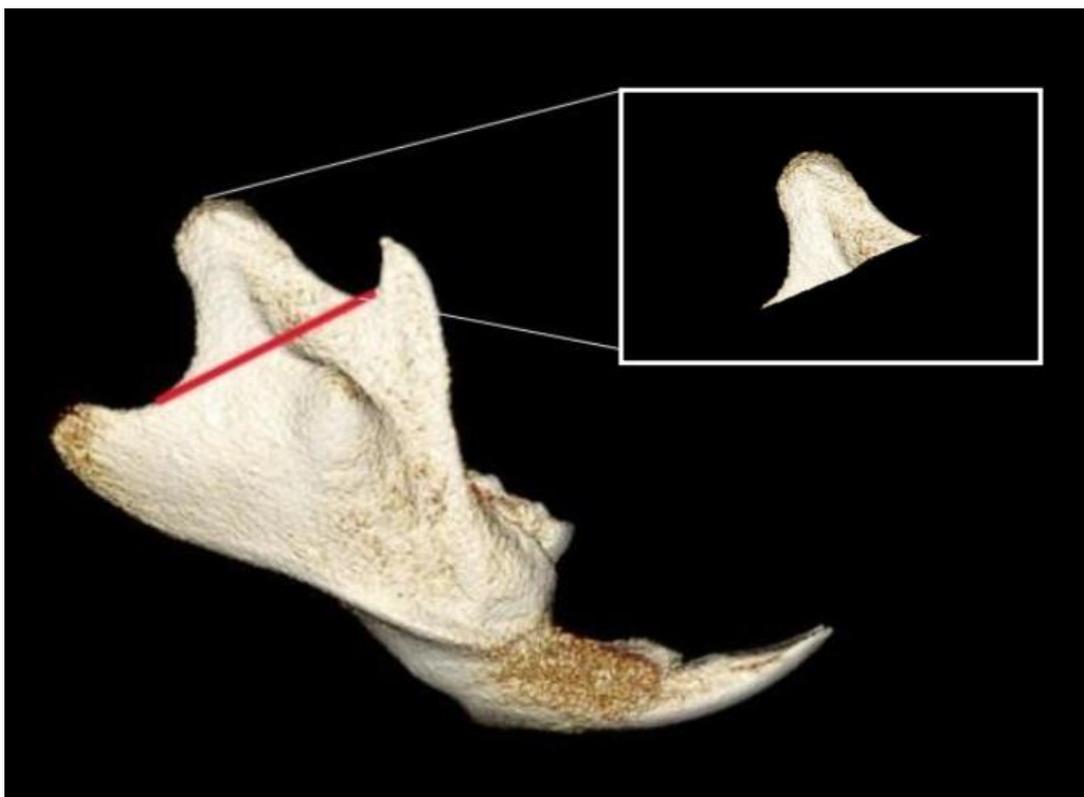
Nota: As medidas com o campo "Descrição" vazias não foram nomeadas pelos autores que as idealizaram.

Para obtenção dos dados qualitativos do côndilo e do palato fez-se o uso do plugin BoneJ do software FIJI (Schindelin *et al.*, 2012). Os valores estruturais obtidos foram grau de anisotropia ("Degree of Anisotropy" -DA), relação quantidade óssea sobre volume total (BV/TV), medida do grau de conexões da estrutura óssea, isto é, conectividade (Conn.D.), espessura média das trabéculas (Tb.Th.) e diâmetro médio das cavidades que contém a medula óssea (Tb.Sp.) (Domander *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2010).

Os parâmetros utilizados no Fiji para análise óssea foram os descritos por Domander *et al.* (2021):

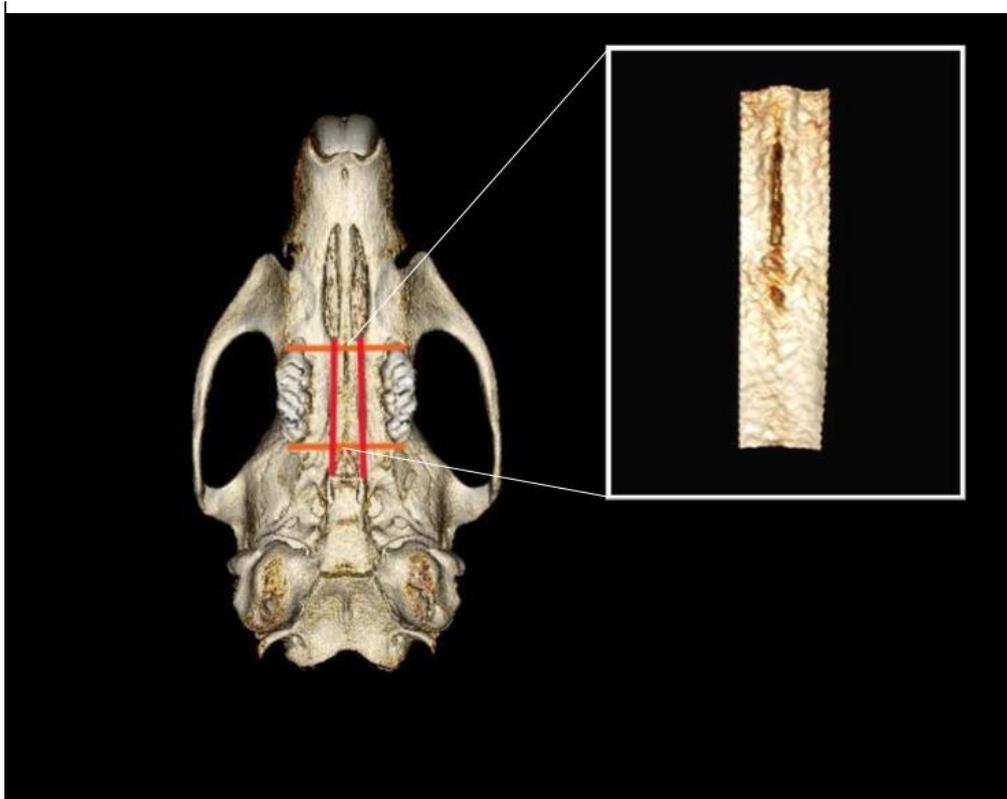
- a) *Gaussian Blur (3D)* com um sigma de 2,0 em todas as 3 dimensões para suavizar o osso;
- b) *Adjust > Threshold*, selecione *Dark background* e *Stack histogram*, clique em *Auto* e depois *aplicar*;
- c) *Converter pilha em binário*, desmarque todas as caixas de seleção e selecione *Método: Padrão, Plano de fundo: escuro*;
- d) *Purify* para remover pequenas partículas de fundo;
- e) *Anisotropy* e selecione *Mínimos recomendados*, clique em *OK* para calcular *DA*;
- f) *Connectivity > conectivity*;
- g) *Moments of inercia*;
- h) *Fraction > "Are/Volume fraction"*;
- i) *Thinkness* e selecione *Both*, clique em *OK* para calcular *Tb Th* e *Tb Sp*;

Figura 5 – Ponto de segmentação do cõndilo para análise quantitativa.



Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

Figura 6 – Ponto de segmentação do palato para análise quantitativa.

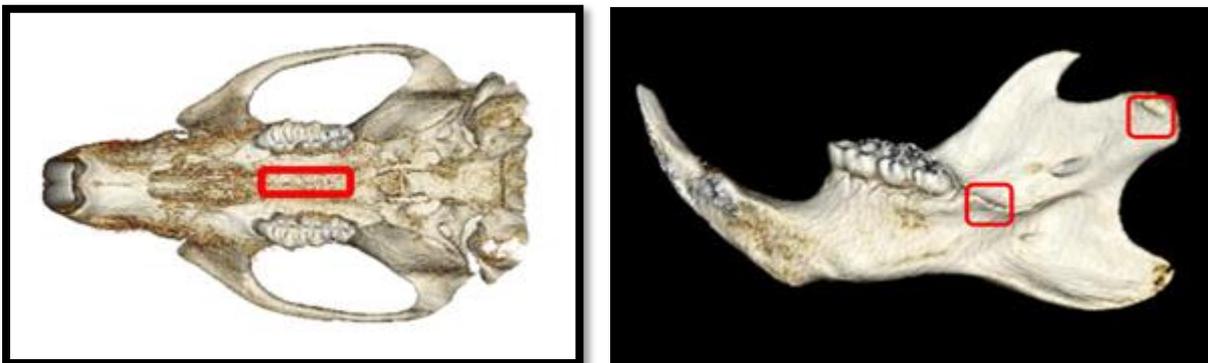


Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

4.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Os protocolos utilizados foram de acordo com Sambrook, Russell (2006) de uso comum na expressão gênica – Reação Quantitativa de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (RT-PCR). Amostras da região do côndilo, região retro molar e da região da sutura palatina foram utilizadas para análise (Figura 7). Inicialmente as amostras foram pesadas para dar sequência às diversas etapas para posterior avaliação da expressão gênica.

Figura 7 – Regiões de segmentação para análise de expressão genica.



Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

4.9.1 Extração de RNA

Com o objetivo de obter o RNA total, as amostras de tecido ósseo foram inicialmente maceradas em grau e pistilo contendo nitrogênio líquido. Depois os tecidos foram imersos em reagente Trizol (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad/CA, EUA), na proporção de 1 mL de Trizol para cada 1 mg de tecido, como recomenda o fabricante, sendo agitado por 30 segundos e mantidos à temperatura ambiente por 5 minutos. Após homogeneização em agitador de tubos, adicionou 0,2 mL de clorofórmio para cada mL de suspensão, e realizou centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos, a 4°C, com formação de duas fases. O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol, sofrendo agitação em vortex e incubado por 20 minutos a -20°C para precipitar o RNA da fase aquosa. Foi feita uma nova centrifugação nos tubos a 10.000 x g, por 10 minutos, a 4°C e, o precipitado foi lavado em etanol a 75% e posteriormente seco à temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram suspensas em 50 µL de água deionizada estéril, tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e livre de RNase, incubadas por 10 minutos a 56°C, e armazenadas no freezer a -80°C.

A concentração de RNA total nas amostras foi determinada por meio de um espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Este equipamento de posse de dois valores de absorbância, 260 e 280 nm, forneceu a quantidade (ng/µL) e qualidade do RNA total.

4.9.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

De acordo com o protocolo descrito pelo fabricante do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA), por reação de transcrição reversa, obteve-se síntese do cDNA a partir do RNA total. As amostras contendo RNA total, foram descongeladas e mantidas em gelo. Novos tubos eppendorfs de 0,1 mL foram preparados e identificadas para transcrição do cDNA. Utilizou-se 2 µg de RNA total de cada amostra para a síntese do cDNA. Adicionou-se às amostras a quantidade recomendada pelo fabricante de cada componente do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (tampão RT, dNTP mix, primers, Multiscribe™ transcriptase reversa e água livre de nuclease) para obtenção de um volume final de 40 µL. As amostras foram colocadas em placas adaptadas para termociclador Veriti (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA) e programado para atingir as condições de ciclagem recomendadas pelo fabricante: as amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos para ligação do primer ao RNA, seguida de incubação a 37°C por 2 horas para transcrição reversa, utilizando a enzima transcriptase reversa, e posterior incubação a 85°C por 5 segundos para inativação da enzima e finalização do processo. Após a obtenção do cDNA, as amostras foram estocadas em freezer a -20°C até a realização do RT-PCR.

4.9.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) após Transcrição Reversa ou PCR em tempo real (RT-PCR)

Os cDNAs dos genes de interesse, *TCIRG1 (OC)*, *OPN*, *RUNX2*, *MMPs 2 E 9*, e do gene constitutivo, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*), foram amplificados em aparelho para PCR em tempo real (tabela 4). As leituras de fluorescência foram realizadas pelo equipamento StepOne Plus® (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA). Para controle negativo usou água deionizada, o *Gapdh* foi utilizado como gene de referência e foi adicionado aos primers RNA de uma amostra, ao invés de cDNA, para confirmar ausência de DNA genômico para os experimentos da reação de RT-PCR.

As amplificações por PCR foram realizadas em duplicata utilizando placas de 96 poços. Para as reações de RT-PCR foram utilizadas 10 ng de cDNA de cada amostra, e adicionadas 10 µL de Taqman® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems®,

Foster City, CA, EUA), 1 μ L de TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA), e acrescido de quantidade necessária de água livre de RNase para obtenção de uma solução com volume final de 20 μ L por poço. Montou-se o layout da placa para as reações de RT-PCR serem lidas no aparelho StepOne Plus®, que realizou as reações de amplificação e detecção.

As condições de amplificação das diferentes etapas da reação de RT-PCR foram realizadas de acordo com as recomendações de tempo e temperatura propostas pelo fabricante: estágio 1- 95°C por 10 minutos para ativação da polimerase; estágio 2- 40 ciclos com temperatura de 95°C por 15 segundos para desnaturação do DNA e 60°C por 1 minuto para anelamento do primer e polimerização.

Os dados foram analisados no software StepOne™ versão 2.3. Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de flutuações na leitura não relacionadas ao PCR, ou seja, flutuações decorrentes das variações de volume e evaporação ao longo da reação de PCR. Os resultados foram analisados com base no valor do ciclo limiar CT (cycle threshold). Os resultados expressos em valores de CT foram transferidos para planilhas e agrupados em dois grupos de estudo ORX e SHAM e de período experimental de 45 e 73 dias.

Tabela 4 - Primers utilizados no RT-PCR em tempo real para os alvos.

ENSAIO	NUMERO DO CATÁLOGO
<i>TCIRG1 (OC)</i>	Mm00505969_cn
<i>OPN</i>	Mm00172574_cn
<i>RUNX2</i>	Mm00655618_cn
<i>MMP 2</i>	Mm00254652_cn
<i>MMP 9</i>	Mm00065775_cn
<i>Gapdh</i>	Mm00186817_cn

Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

4.9.4 Análise dos Resultados

Com o intuito de avaliar a eficiência de amplificação de cada gene-alvo, foi realizado diluições seriadas de cDNA para que sejam submetidas à amplificação nas mesmas condições acima citadas. O gráfico gerado pela concentração de cDNA e os respectivos valores de CT foi empregado para o cálculo da equação de regressão e a

correlação entre as variáveis pelo R-quadrado.

Foi utilizado o programa 7500 systems software para analisar os dados ópticos de todas as amostras, calcular os $\Delta\Delta CT$ e por fim a quantificação relativa (QR). O Método $\Delta\Delta CT$ foi validado para o cálculo da expressão relativa de todos os genes avaliados por meios dos primers utilizados no presente estudo. Em cada amostra, o ΔCQ é determinado subtraindo o CT do gene de referência do CT do gene de referência da mesma amostra, gerando assim o ΔCT . O cálculo de expressão relativa ($\Delta\Delta CT$) foi realizado a partir da diferença entre o ΔCT do gene da amostra do grupo de intervenção (ORX) e o ΔCT do mesmo gene apresentado pelo grupo controle (SHAM).

A quantificação relativa foi obtida usando a expressão $QR=2^{-\Delta\Delta CT}$, e representa a proporção da expressão de um gene expresso na amostra de intervenção ORX em relação ao gene expresso na amostra controle SHAM.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados das medidas cefalométricas foram tabulados no programa Microsoft Excel e a análise estatística foi realizada no software IBM SPSS Statistics for Windows (Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp). A média aritmética das medidas obtidas em triplicata foi considerada a variável dependente do estudo. O teste de Mann-Whitney foi aplicado devido ao n de cada grupo ser menor que 30. Os grupos experimentais ORX e SHAM foram comparados em cada tempo experimental. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Os resultados do RT-PCR para cada gene foram agrupados de acordo com os diferentes grupos de estudo e de período experimental, e submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Bonferroni. A diferença foi considerada estatisticamente significante quando $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

Sete animais não completaram o experimento devido às complicações na anestesia (n=5) e lesões por mordedura (n=2). Com as seguintes distribuições entre os grupos: 3 perdas – ORX 45 dias, 2 perdas – ORX 73 dias, 1 perda - SHAM 45 dias, 1 perda – SHAM 73 dias.

5.1 MEDIDAS CEFALOMÉTRICAS

A comparação entre as médias das medidas microtomográficas entre os grupos ORX e SHAM, aos 45 e 73 dias, estão nas tabelas 5 e 6. No geral, as medidas lineares dos crânios e mandíbulas não seguiram uma tendência no grupo ORX em relação ao grupo SHAM, isto é, algumas medidas foram maiores e outras menores estatisticamente. Houve também medidas que não apresentaram diferença entre os grupos ($p>0,05$).

Nas medidas cranianas, o comprimento do osso nasal (1-2) e a altura facial (2-11) tiveram medidas menores no grupo ORX em ambos os períodos de 45 e 73 dias ($p<0,05$).

A altura craniana anterior (3-13), o comprimento anterior da base do crânio (2-14), plano dentário frontal (18-22), largura nasal (9R-9L), largura Inter zigomática (7L-7R), largura frontal (6L-6L) e as medidas 20-20, 17-17, 3-9 foram menores no grupo ORX do que no grupo SHAM aos 45 dias, com diferenças estatisticamente significativas. As medidas 9-9, 18-18, 3-7 e comprimento do segmento posterior foram menores e estatisticamente significantes no grupo ORX em relação ao grupo Sham aos 73 dias ($p<0,05$).

Algumas medidas foram estatisticamente maiores no grupo ORX em relação ao SHAM no crânio: 3-4, plano médio sagital (19-23) no período de 45 dias. Medidas 2-3, largura zigomática anterior (5-5) e comprimento do diastema (D) foram maiores no período de 73 dias ($p<0,05$).

Não foram encontrados diferenças significativas no crânio para o osso frontal (2-3), osso parietal (3-4), comprimento facial (1-12), ângulo médio da abóbada craniana (2-3-4), plano médio sagital (1-23), largura facial (8R-8L) e largura do arco (40-40) em ambos os períodos ($p>0,05$).

Tabela 5 – Comparação das medidas lineares e angulares do crânio (mm).

SEGMENTO	45 DIAS			73 DIAS		
	ORX	SHAM	p	ORX	SHAM	p
	Média (DP)	Média (DP)		Média (DP)	Média (DP)	
CRÂNIO LATERAL						
1-2	13,56 (0,14)	13,93 (0,20)	0,039	16,18 (0,19)	17,14 (0,17)	0,020
2-3	13,31 (0,58)	13,49 (0,50)	0,439	13,68 (0,21)	13,69 (0,90)	>0,999
3-4	8,20 (0,15)	7,99 (0,36)	0,439	8,39 (0,24)	8,22 (0,30)	0,197
1-12	25,16 (0,29)	25,15 (0,28)	0,795	27,52 (0,19)	27,53 (0,16)	>0,999
2-14	8,39 (0,13)	8,90 (0,25)	0,020	10,52 (0,39)	10,16 (0,15)	0,121
2-11	9,90 (0,03)	10,31 (0,20)	0,020	11,29 (0,23)	11,81 (0,13)	0,020
3-13	9,22 (0,13)	10,32 (0,71)	0,039	11,16 (0,12)	11,00 (0,21)	0,302
ÂNGULOS						
13-2-3	38,52 (1,15)	46,22(1,61)	0,020	43,90 (3,23)	41,36 (0,98)	0,302
2-3-4	167,70 (1,97)	155,04 (8,09)	0,071	170,07 (3,33)	166,68 (6,97)	0,302
12-2-1	117,82 (1,51)	114,09 (1,20)	0,020	110,39 (2,46)	113,74 (1,99)	0,121
13-2-10	116,22 (0,70)	106,05 (2,01)	0,020	112,05 (4,98)	107,96 (0,49)	0,606
CRÂNIO FRONTAL						
1-23	15,31 (0,03)	15,36 (0,22)	0,517	18,32 (2,22)	18,79 (0,20)	0,796
19-23	11,45 (0,26)	10,99 (0,03)	0,020	13,26 (0,98)	14,12 (0,12)	0,300
18-22	8,21 (0,26)	9,32 (0,19)	0,020	8,97 (0,32)	9,46 (0,09)	0,071
1-22	21,10 (0,30)	21,45 (0,48)	0,197	21,98 (1,43)	22,52 (0,14)	>0,999
1-16	20,09 (0,25)	20,00 (0,23)	0,796	20,33 (1,86)	21,11 (0,48)	>0,999
15-15	10,78 (0,12)	10,95 (0,17)	0,197	11,85 (0,23)	12,23 (0,10)	0,039
16-16	20,05 (0,11)	18,95 (0,12)	0,020	20,90 (0,07)	21,46 (0,20)	0,020
20-20	18,78 (0,04)	17,92 (0,35)	0,020	18,76 (0,19)	18,69 (0,01)	>0,999
17-17	8,59 (0,05)	8,77 (0,05)	0,020	8,98 (0,21)	9,01 (0,11)	>0,999
18-18	8,28 (0,11)	8,21 (0,18)	0,300	9,08 (0,38)	8,43 (0,34)	0,028
SUPERIOR DO CRÂNIO						
1 - 2	13,02 (0,02)	14,09 (0,35)	0,020	15,53 (0,48)	16,28 (0,16)	0,020
2 - 3	13,08 (0,15)	13,28 (0,52)	>0,999	13,57 (0,13)	13,13 (0,17)	0,020
2-7	12,72 (0,24)	12,83 (0,74)	>0,999	14,30 (0,52)	14,62 (0,18)	0,606
3-9	22,11 (0,12)	22,77 (0,31)	0,039	24,05 (0,27)	24,01 (0,12)	0,364
3-7	15,73 (0,07)	15,76 (0,12)	0,697	16,56 (0,22)	16,93 (0,07)	0,039
9(L) – 9(R)	6,60 (0,10)	6,10 (0,19)	0,020	6,96 (0,49)	6,90 (0,13)	0,796
8(L) – 8(R)	10,48 (0,06)	10,70 (0,21)	0,071	11,39 (0,15)	11,43 (0,09)	0,606
7(L) – 7(R):	19,88 (0,14)	19,06 (0,41)	0,020	21,31 (0,48)	21,54 (0,05)	>0,999
6(L)–6(R):	11,37 (0,15)	10,96 (0,27)	0,019	10,63 (0,46)	10,98 (0,12)	0,243
5(L)–5(R)	15,64 (0,38)	15,19 (0,45)	0,439	15,93 (0,44)	15,29 (0,17)	0,039
INFERIOR DO CRÂNIO						
40 – 40	6,96 (0,13)	7,00 (0,31)	0,152	6,97 (0,12)	7,15 (0,18)	0,152
39 - 39	5,96 (0,25)	6,04 (0,13)	0,796	6,28 (0,56)	6,73 (0,01)	0,435
F	19,65 (0,08)	19,48 (0,61)	0,439	20,58 (0,09)	20,94 (0,22)	0,039
E	7,66 (0,07)	7,52 (0,13)	0,154	7,31 (0,24)	7,79 (0,19)	0,038
D	12,24 (0,02)	12,12 (0,57)	0,121	13,42 (0,13)	13,11 (0,20)	0,028

Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

Notas: DP: Desvio Padrão. Teste Man-Whitney foi utilizado. Valores em negrito indicam significância estatística ($p < 0,05$).

Nas medidas da mandíbula, o comprimento do diastema (B) apresentou medida menor no grupo ORX e estatisticamente significativa em ambos os períodos de 45 e 73

dias. A largura do côndilo e a medida 29-25 foram menores no grupo ORX do que no grupo SHAM aos 45 dias ($p < 0,05$). A largura mandibular (25-25), largura do côndilo, a distância intercoronóide (35-35), distância entre os forames mentais (24-24), largura do arco (38-38), comprimento do seguimento posterior do arco (A) e superior mandibular (26-32) foram maiores no grupo ORX em relação ao grupo Sham aos 73 dias ($p < 0,05$).

Tabela 6 – Comparação das medidas lineares e angulares da mandíbula (mm).

SEGMENTO	45 DIAS			73 DIAS		
	ORX	SHAM		ORX	SHAM	
	Média (DP)	Média (DP)	p	Media (DP)	Média (DP)	p
FRONTAL MANDÍBULA						
25(R)-25(L)	17,47 (0,05)	16,91 (0,26)	0,020	17,17 (0,26)	17,78 (0,17)	0,020
21 -21	11,30 (0,06)	11,19 (0,16)	0,300	11,81 (0,16)	11,94 (0,20)	0,439
22 -22	8,60 (0,10)	8,89 (0,35)	0,197	9,19 (0,11)	9,12 (0,07)	0,364
17 – 17	8,76 (0,36)	8,81 (0,11)	0,697	9,19 (0,38)	9,21 (0,08)	>0,999
24 - 24	7,19 (0,11)	7,15 (0,10)	0,515	7,31 (0,14)	7,66 (0,05)	0,020
SUPERIOR MANDÍBULA						
largura condilar	1,54 (0,35)	1,96 (0,08)	0,020	1,58 (0,08)	1,68 (0,12)	0,195
20(R)-20(L)	18,09 (0,13)	17,03 (0,29)	0,020	17,79 (0,03)	17,99 (0,03)	0,019
35(R)-35(L)	17,21 (0,04)	16,71 (0,18)	0,020	17,85 (0,09)	18,10 (0,09)	0,019
34(R)-34(L)	16,86 (0,04)	15,47 (0,07)	0,018	16,49 (0,19)	16,60 (0,05)	0,604
36(R)-36(L)	5,56 (0,09)	5,38 (0,17)	0,070	5,35 (0,13)	5,56 (0,15)	0,197
38(R)-38(L)	9,10 (0,14)	8,86 (0,07)	0,020	8,88 (0,14)	9,11 (0,12)	0,070
37(R)-37(L)	5,83 (0,10)	5,68 (0,03)	0,019	6,30 (0,27)	6,36 (0,04)	>0,999
A	7,80 (0,09)	7,79 (0,11)	0,795	7,49 (0,22)	7,94 (0,13)	0,020
B	5,44 (0,11)	5,99 (0,36)	0,020	4,91 (0,35)	5,83 (0,11)	0,020
C	17,87 (0,13)	17,95 (0,13)	0,300	18,90 (0,24)	18,76 (0,11)	0,302
LATERAL DA MANDÍBULA						
26-27	6,99 (0,10)	7,39 (0,69)	0,121	8,57 (0,08)	8,01 (0,07)	0,020
26-32	23,46 (0,04)	23,56 (0,10)	0,300	25,29 (0,38)	25,78 (0,09)	0,028
27-29	17,75 (0,13)	17,63 (0,55)	>0,999	19,55 (0,16)	19,58 (0,28)	0,897
27-25	8,56 (0,05)	8,33 (0,20)	0,071	9,75 (0,08)	9,02 (0,05)	0,020
29-28	14,60(0,05)	14,94 (0,65)	>0,999	15,46 (0,27)	15,52 (0,16)	0,606
29-25	19,22 (0,14)	19,91 (0,14)	0,020	21,71 (0,18)	21,50 (0,02)	0,120
30-31	9,56 (0,06)	9,58 (0,56)	>0,999	11,19 (0,20)	10,70 (0,01)	0,020
32-33	6,65 (0,23)	6,42 (0,05)	0,431	7,20 (0,31)	7,79 (0,05)	0,020
32-31	5,78(0,02)	5,78 (0,05)	>0,999	6,75 (0,32)	6,27 (0,16)	0,039
28-25	10,57 (0,05)	10,35 (0,16)	0,195	11,93 (0,25)	11,87 (0,02)	>0,999
ÂNGULOS						
28-29-31	134,81 (0,72)	132,77 (1,44)	0,121	132,86 (1,17)	134,86 (0,71)	0,039
25-28-29	99,64 (0,37)	100,84 (2,11)	0,796	102,98 (0,89)	101,62 (0,61)	0,071
31-27-32	45,56 (0,36)	43,48 (0,58)	0,020	45,89 (1,40)	42,42 (0,40)	0,020

Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

Notas: DP: Desvio Padrão. Teste Man-Whitney foi utilizado. Valores em negrito indicam significância estatística.

As medidas 25-25, distância intercondilar (20-20), intercoronóide (35-35), entre as incisuras sigmoides (34-34), largura do arco (38-38) e distância intermolar (37-37) foram maiores no grupo ORX aos 45 dias ($p < 0,05$). Comparadas ao grupo de 73 dias,

as seguintes medidas mandibulares também foram maiores no grupo ORX e estatisticamente significativas: altura mandibular (26-27), 27-25, 30-31 e 32-31 ($p < 0,05$).

Com relação aos ângulos, observou medidas menores no grupo ORX do ângulo rostral da cavidade craniana (13-2-3) aos 45 dias e do ângulo 28-29-31 aos 73 dias. Medidas maiores foi observado no grupo ORX do ângulo "snout" (12-2-1), o ângulo crânio-maxila (13-2-10), somente no período de 45 dias. O ângulo maxila-mandíbula (31-27-32), apresentou medidas maiores, no grupo ORX, em ambos os períodos, 45 e 73 dias ($p < 0,05$).

Não foram encontradas diferenças significativas na mandíbula para o comprimento do arco (C), altura mandibular inferior (27-29), medidas 21-21, 22-22, 17-17, 28-25 e ângulo crânio mandibular (5-2-12), em ambos os períodos ($p > 0,05$).

Com relação as 7 medidas angulares analisadas, 3 ângulos cranianos apresentaram números estatisticamente diferentes no crânio de 45 dias, o ângulo 13-2-3 foi maior no grupo SHAM e os ângulos 12-2-1 e 13-2-10 foram maiores no grupo ORX, ou seja, os crânios do grupo SHAM tenderam a apresentar um crescimento mais verticalizados e os do grupo ORX um crescimento mais horizontal. Estas medidas não se repetiram nos crânios de 73 dias, e não houve diferença estatística entre os grupos em questão. Com relação às medidas angulares da mandíbula, estas apresentaram diferenças estatisticamente significativas em dois ângulos no período de 73 dias, medidas estas que estão relacionadas ao incisivo inferior dos ratos. Os ângulos 28-29-31 nos mostra que o incisivo inferior se mostrou mais verticalizado no grupo ORX do que no grupo SHAM. O ângulo 31-27-32 e as medidas lineares 30-31 e 32-31 mostram que a média de tamanho dos incisivos inferiores no grupo ORX é maior que os incisivos inferiores do grupo SHAM.

5.2 VOLUME ÓSSEO, ANISOTROPIA E TRABECULADO DO CÔNDILO

Na comparação das médias dos grupos (tabela 7), a orquiectomia não alterou significativamente as estruturas do trabeculado condilar, ($p < 0,05$). As medidas VB/TV e Conn. D, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$). A medida de anisotropia não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,165$).

Na avaliação do trabeculado das amostras dos côndilos, não houve diferença

estatisticamente significativa ($p>0,05$), tanto na espessura trabecular (Tb. Th.), quanto no espaçamento das trabéculas (Tb. Sp.).

Tabela 7 – Análise quantitativa do cõndilo.

	45 DIAS			73 DIAS		
	ORX	SHAM		ORX	SHAM	
	Média (DP)	Média (DP)	<i>p</i>	Média (DP)	Média (DP)	<i>p</i>
DA	0,81 (0,02)	0,83 (0,02)	0,348	0,84 (0,02)	0,82 (0,14)	0,165
BV	14,78 (0,92)	13,55 (0,72)	0,165	14,63 (0,54)	13,89 (0,62)	0,165
BV/TV	0,18 (0,002)	0,13 (0,01)	0,064	0,11 (0,03)	0,10 (0,05)	>0,999
Conn, D	0,009 (0,01)	0,006 (0,03)	0,814	0,018 (0,10)	0,010 (0,01)	0,355
Tb. Th. (mm)	0,83 (0,00)	0,78 (0,08)	0,355	0,74 (0,05)	0,73 (0,01)	>0,999
Tb. Sp. (mm)	3,30 (0,06)	4,46 (0,60)	0,064	4,90 (0,45)	4,83 (1,01)	>0,999

Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

Notas: DP: Desvio Padrão. Teste Man-Whitney foi utilizado. Significância estatística: $p<0,05$. DA: anisotropia, BV: volume ósseo, TV: volume total, BV/TV: quantidade óssea em função do volume da amostra, CONN. D: número de trabéculas conectadas, TB. Th: espessura trabecular, TB Sp: separação trabecular.

5.3 VOLUME ÓSSEO, ANISOTROPIA E TRABECULADO DO PALATO

No palato não houve diferenças nas medidas estruturais ósseas entre grupo ORX e SHAM analisadas (tabela 8). A orquiectomia não alterou o volume ósseo (BV) e o grau de anisotropia (DA), $p=0,05$ e $p=0,82$ respectivamente.

A proporção volume ósseo/ volume total e no Conn.D não apresentaram diferença estatística, $p=0,50$ e $p=0,51$ respectivamente. A avaliação do trabeculado das amostras do palato, não apresentou diferença tanto na espessura trabecular ($p=0,12$), quanto no espaçamento das trabéculas ($p=0,51$).

Tabela 8 – Análise quantitativa do palato.

	ORX	SHAM	<i>p</i>
	Média (DP)	Média (DP)	
DA	0,80 (0,07)	0,81 (0,04)	0,825
BV	7,83 (0,41)	9,06 (0,29)	0,050
BV/TV	0,21 (0,09)	0,14 (0,02)	0,507
Conn, D	0,24 (0,14)	0,22 (0,32)	0,513
Tb. Th. (mm)	0,61 (0,01)	0,57 (0,04)	0,127
Tb. Sp. (mm)	2,02 (0,90)	2,44 (0,37)	0,513

Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

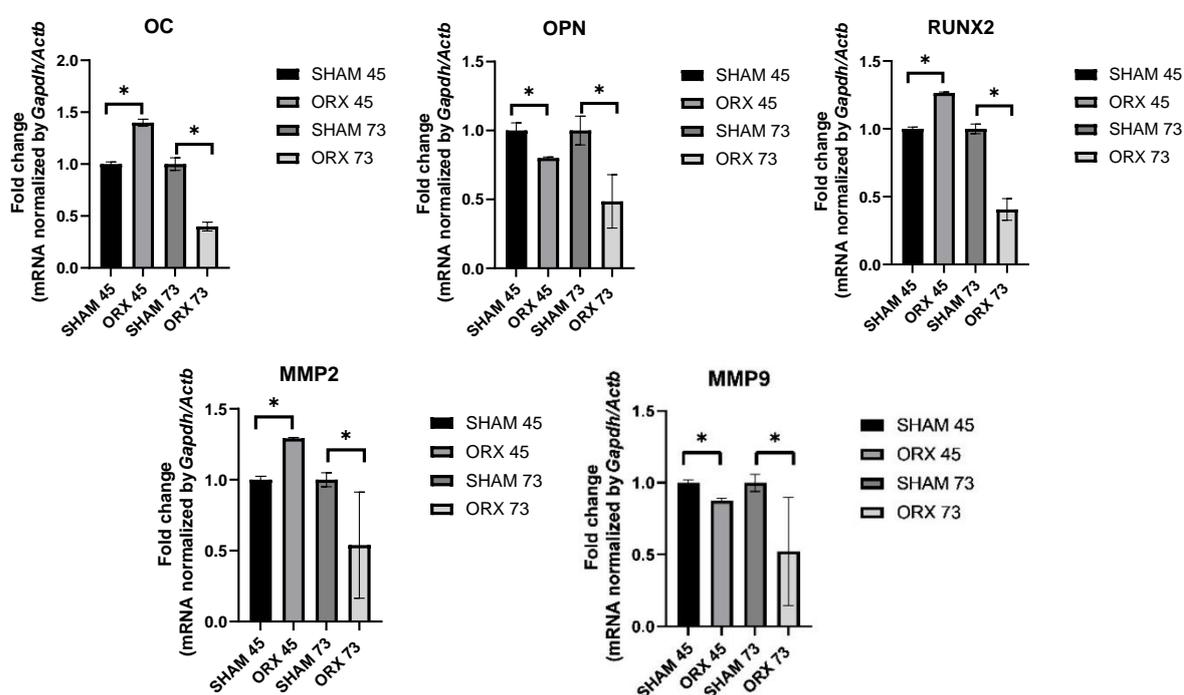
Notas: DP: Desvio Padrão. Teste Man-Whitney foi utilizado. Significância estatística: $p<0,05$. DA: anisotropia, BV: volume ósseo, TV: volume total, BV/TV: quantidade óssea em função do volume da amostra, CONN. D: número de trabéculas conectadas, Tb. Th.: espessura trabecular, Tb. Sp.: separação trabecular.

5.4 RESULTADO DA EXPRESSÃO GÊNICA.

A orquiectomia causou alteração na expressão dos genes relacionados ao desenvolvimento ósseo da região retro molar, nos dois tempos experimentais entre os grupos ORX e SHAM (Figura 8), $p < 0,05$. Houve um valor estatisticamente menor de *OPN* e *MMP 9* no grupo ORX em relação ao grupo SHAM nos dois tempos experimentais.

E em relação aos genes *OC*, *RUNX2* e *MMP 2* houve um aumento da expressão na amostra de 45 dias no grupo ORX. Mas foi observado que na amostra de 73 dias, estes mesmos genes apresentaram redução em relação ao grupo controle de forma estatisticamente significativa.

Figura 8 - Expressão gênica de biomarcadores na região retro molar nos grupos SHAM e ORX de 45 e 73 dias.

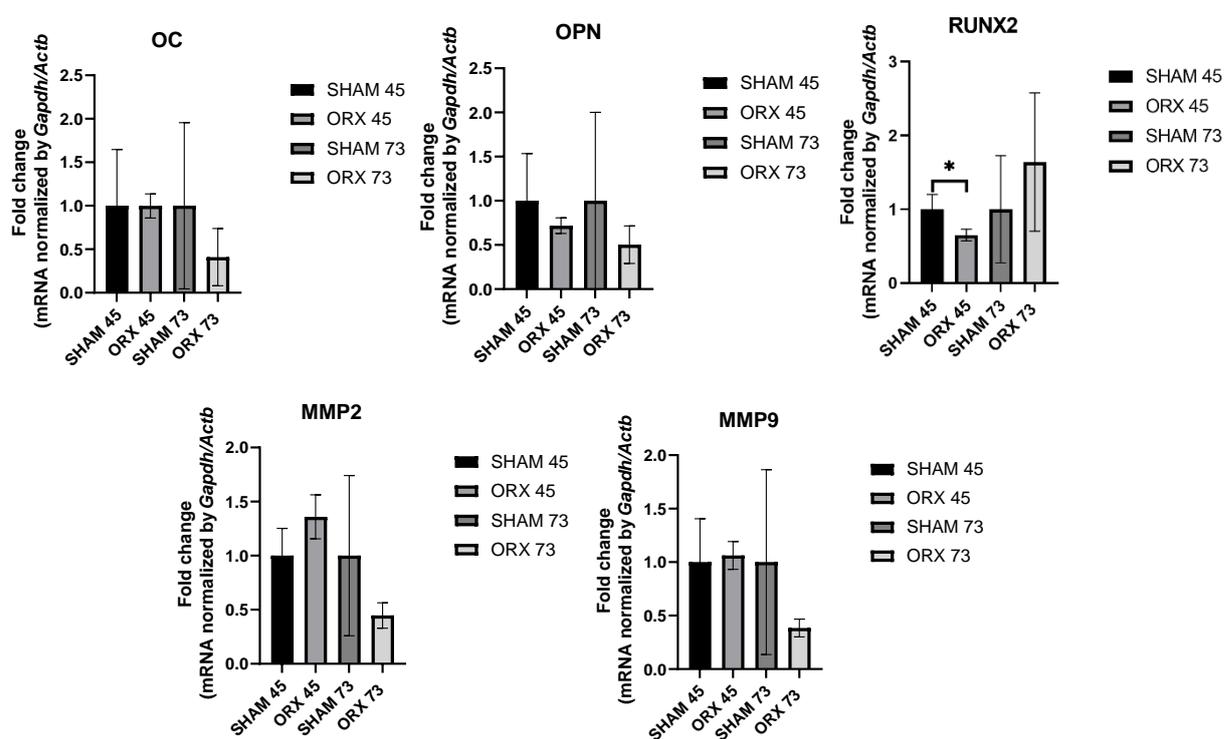


Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

Nota: * indica diferença significativa em relação aos controles ($p < 0,05$).

A expressão de genes da região condilar está demonstrada na figura 9. Não foi encontrado diferenças na expressão gênica dos biomarcadores analisados das amostras do côndilo com supressão de testosterona, com exceção do *RUNX2*, que foi menos expresso no grupo ORX comparado ao grupo SHAM na amostra de 45 dias ($p < 0,05$).

Figura 9 – Expressão gênica de biomarcadores no côndilo nos grupos SHAM e ORX de 45 e 73 dias.

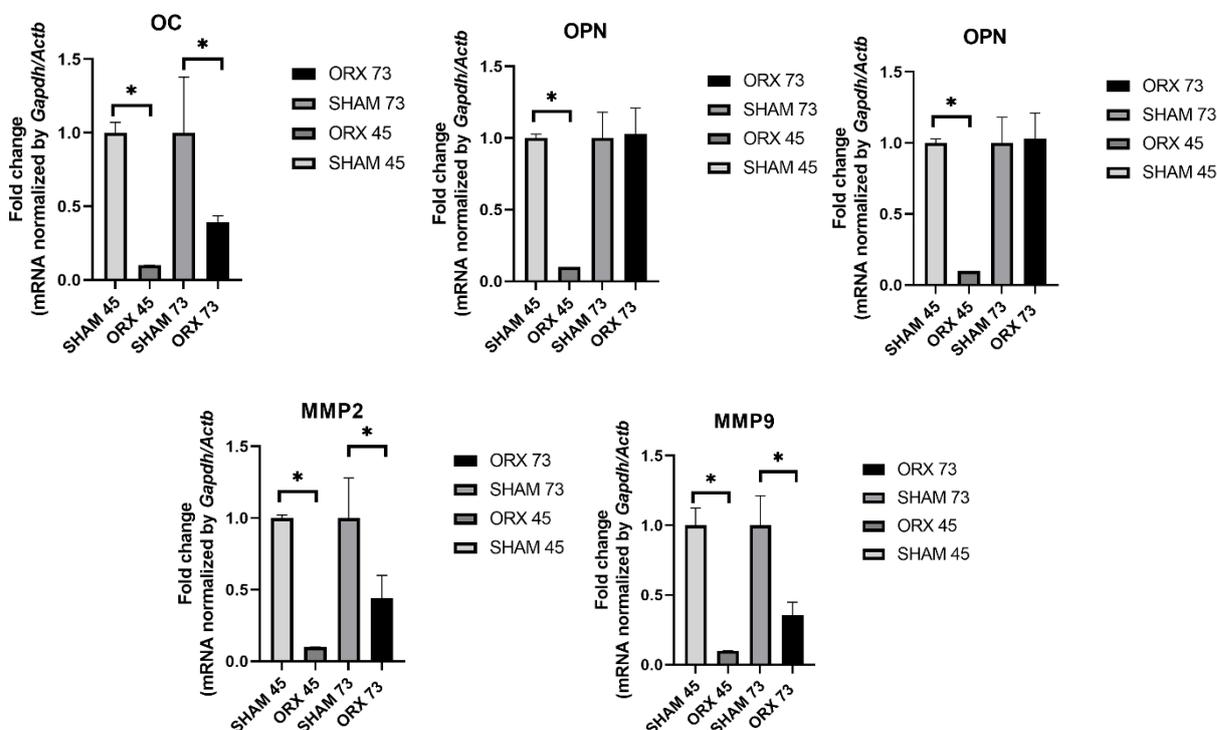


Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

Nota: * indica diferença significativa em relação aos controles ($p < 0,05$).

Todas as expressões de genes, das amostras analisadas na região da sutura palatina (figura 10) apresentaram redução da expressão no grupo de intervenção na amostra do período de 45 dias ($p < 0,05$). Nas amostras de 73 dias, *RUNX2*, *MMP 2*, *MMP 9* e *OC* ficaram menos expressos no grupo ORX ($p < 0,05$). A expressão dos genes relativos ao *FGF 2* foi maior no grupo ORX em relação ao SHAM no período de 73 dias. Não apresentou diferença de expressão da *OPN*, período de 73 dias, no grupo de intervenção comparado ao controle ($p > 0,05$).

Figura 10 - Expressão gênica de biomarcadores na de sutura palatina nos grupos SHAM e ORX de 45 e 73 dias.



Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

Nota: * indica diferença significativa em relação aos controles ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Atualmente a micro CT tem sido amplamente utilizada para caracterizar micro estruturas ósseas e avaliar morfologia e densidade mineral. O presente estudo demonstrou que a orquiectomia produziu alteração em muitas medidas no grupo ORX em comparação ao grupo SHAM, colaborando para confirmar a hipótese de que a supressão de testosterona altera o crescimento e desenvolvimento craniofacial. Além disso, a associação da expressão de genes, de proteínas relacionadas desenvolvimento e manutenção óssea (*OC*, *OPN*, *RUNK2*, *MMP2* e *MMP9*), em animais com supressão de testosterona foi investigada pela primeira vez.

A supressão deste hormônio alterou grande parte das medidas maxilares e mandibulares durante a puberdade de ratos orquiectomizados no 23^o dia de vida ($p < 0,05$), mas o volume e estrutura óssea trabecular do côndilo dos ratos

orquiectomizados não foi influenciado de forma estatisticamente significativa. Estes resultados corroboram com Fujita *et al.* (2006), Reis *et al.* (2022) e Verdonck; De Ridder; Kühn *et al.* (1998) de que a supressão de testosterona influencia mais a ossificação intramembranosa do que a endocondral. E também, segundo estes autores, a testosterona não influencia o crescimento durante a infância animal, mas apenas durante o período de 40 a 50 dias de vida. Este período corresponde ao pico da sua produção da testosterona e também de GH e IGF-1 em animais saudáveis (Handelsman *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1975). Por isso o presente estudo avaliou as amostras no meio da puberdade aos 45 dias, e no fim da puberdade aos 73 dias, e como nos trabalhos de Fujita *et al.* (2006), Márquez Hernández *et al.* (2011) e Verdonck; De Ridder; Kühn *et al.* (1998) houve impacto da supressão de testosterona na formação óssea. Muitas medidas cranianas e mandibulares foram estatisticamente menores nos grupos orquiectomizados e outras medidas foram maiores ao comparar os grupos, com 45 dias e de 73 dias de vida.

Sugere-se que o processo normal de queda dos hormônios de crescimento possa igualar o crescimento entre os grupos com o passar do tempo (Verdonck; De Ridder; Kühn *et al.*, 1998). Isso justifica que há medidas cefalométricas estatisticamente diferentes no período de 45 dias e que não apresentaram diferenças no período de 73 dias, ou seja, o crescimento não manteve uma constância ao longo do tempo. Outro fator que pode ter influenciado é o fato de os ratos serem heterogêneos, as diferenças genéticas podem resultar em medidas lineares diferentes.

Existem muitos trabalhos analisando as dimensões ósseas em ratos com supressão da testosterona, mas com resultados controversos. Fujita *et al.* (2004, 2006) encontraram inibição do crescimento craniofacial, já Chin e Ima-Nirwana (2015), avaliando os efeitos da testosterona sub e supra fisiológica não encontraram alteração na forma óssea. Em nosso trabalho, encontramos alterações de medidas ósseas, provocando distorção de tamanho durante o crescimento ósseo. Nas amostras de 45 dias do crânio, os animais do grupo SHAM tenderam a apresentar uma direção de crescimento mais verticalizado e os do grupo ORX um crescimento mais horizontal. Estas diferenças não se repetiram nos crânios de 73 dias, e não houve diferença estatística entre os grupos neste período.

As estruturas cranianas são diferentemente reguladas pelo estímulo da testosterona (Verdonck; De Ridder; Kühn *et al.*, 1998). Com relação a mandíbula, ela apresentou diferenças estatisticamente significativas em dois ângulos no período de 73

dias, medidas estas que estão relacionadas ao incisivo inferior dos ratos. O incisivo inferior se mostrou mais verticalizado no grupo ORX e a média de tamanho dos incisivos inferiores no grupo ORX foi maior que os incisivos inferiores do grupo SHAM. Mas, os ângulos podem ser influenciados, além de alterações hormonais, por fatores mecânicos e alterações funcionais na oclusão (Fujita *et al.*, 2004). Outros estudos futuros devem ser realizados a fim de esclarecer possíveis especificidades entre as estruturas cranianas que as tornam diferentemente sensíveis aos hormônios.

Reis *et al.* (2022) demonstraram que a camada de células pré-condroblásticas foi mais espessa nos grupos ORX comparada ao grupo controle, indicando influência da testosterona sobre a diferenciação destas células precursoras em condroblastos. Fujita *et al.* (2006) também avaliou, por meio de tomografia computadorizada quantitativa periférica, a região condilar de ratos orquiectomizados aos 60 dias de vida e observou dimensões maiores no grupo de intervenção do que o de controle. Nosso estudo avaliou os efeitos da orquiectomia em microtomografias do côndilo mandibular por meio do software FIJI, em cinco aspectos estruturais do osso trabecular (DA, BV/TV, Conn.D., Tb.Th., Tb.Sp) e, ao contrário de Fujita *et al.* (2006), não encontramos diferenças entre os grupos ORX e SHAM no volume condilar ($p > 0,05$). Essa diferença de resultados pode ter ocorrido por diferenças nos métodos de avaliação estrutural óssea.

Como o côndilo mandibular é um centro de crescimento na mandíbula, sugere-se que baixos níveis de testosterona possam atrasar ossificação endocondral durante a puberdade e que esta supressão interfira na completa ocupação de matriz óssea mineralizada do disco epifisário (Biga *et al.*, 2019; Fujita *et al.*, 2006). Como o *RUNX2* é um fator de transcrição fundamental na ossificação endocondral (Komori, 2022), suspeitávamos que ele seria super expresso na região condilar, mas isso não ocorreu. Na nossa amostra de 45 dias, ele foi menos expresso no grupo ORX, momento em que seria o pico de produção de testosterona. Neste trabalho a supressão de testosterona não alterou a expressão dos outros genes analisados e consequentemente não obtivemos diferenças na quantidade óssea e estrutura do trabeculado ósseo do côndilo.

Ao contrário dos nossos achados, Chin e Ima-Nirwana (2015) observaram medidas estatisticamente significativas menores na quantidade óssea sobre volume total (BV/TV), diâmetro médio das cavidades que contém a medula óssea (Tb.Sp.) e conectividade (Conn.D.) em tíbias de ratos orquiectomizados. A diferença de achados pode ser devido a ação da testosterona ser diferente dependendo da região anatômica

de sua ação.

Na avaliação da expressão dos genes desta pesquisa, na região de sutura palatina, os achados foram estatisticamente significativos, sendo que todos os genes foram menos expressos no grupo ORX em relação ao grupo SHAM nos períodos de 45 e 73 dias. Mas, ao contrário da expressão gênica, nas microtomografias os valores obtidos na quantificação do palato em relação a estrutura óssea para o DA, BV/TV, Conn.D., Tb.Th., Tb.Sp. e medidas lineares (39-39 e 40-40) não foram estatisticamente significativos nesta região óssea. O que pode ter causado esta inconsonância é o uso, no software FIJI, do *threshold* em padrão automático como recomenda Domander *et al.* (2021). Como os valores de *threshold* podem apresentar variação nas escalas de cinza sobre o que considerar como sendo osso de uma amostra para outra neste formato, os resultados podem ter sofrido variação nas medidas. Em análises futuras recomenda-se a avaliação das amostras com o *threshold* em um padrão fixo.

Correlacionando os resultados obtidos da micro CT da mandíbula e expressão gênica na região retro molar, observamos que muitas medidas relacionadas à largura foram maiores ($p < 0,05$) no grupo ORX em relação ao SHAM no período de 45 dias. Já estas medidas de largura, após o período da puberdade (73 dias), foram maiores ($p < 0,05$) no grupo SHAM. Correlacionando estes resultados da expressão dos genes da região retro molar da mandíbula, os genes *OC*, *RUNK2* e *MMP2*, foram mais expressos no grupo ORX no período de 45 dias e no período de 73 dias menos no grupo ORX em relação ao grupo SHAM. Nossa hipótese é que as expressões destes genes podem estar relacionadas às medidas obtidas da largura mandibular. Dessa forma, outros estudos são necessários para elucidação do mecanismo envolvido na regulação da expressão dos genes.

A anisotropia é uma medida importante para avaliar o sentido de formação das trabéculas, isto é, para quantificar a direção do osso trabecular. Para saber se as trabéculas têm uma determinada orientação ou se estão alinhadas aleatoriamente. O score vai de 0,0 a 1,0, isto é, 0,0 significa que a imagem é completamente isotrópica, e a amostra não tem nenhuma direcionalidade e 1,0 significa que há uma orientação extrema predominante na estrutura da imagem (Domander *et al.*, 2021). Na nossa avaliação dos cêndilos, observamos que no período de 45 dias o grupo ORX apresentou um grau de alinhamento trabecular menor que no grupo controle e no período de 73 dias, o grupo SHAM apresentou um grau menor de anisotropia, mas nenhum dos dois tempos experimentais os valores foram estatisticamente

significativos. O que nos permite inferir que a supressão de testosterona pode não influenciar a orientação do trabeculado condilar durante a puberdade.

Mesmo que ainda não tenha sido totalmente elucidado o papel dos receptores de hormônios sexuais no controle do crescimento ósseo, sabe-se que estes influenciam a complexa rede de interação molecular envolvida com o crescimento ósseo e cartilaginoso (Márquez Hernández *et al.*, 2011; Omori *et al.*, 2020). Analisando os resultados da RT-PCR do nosso trabalho, observamos que houve alteração da transcrição dos genes quando da supressão de testosterona e de maneira diferente dependendo da localização da região do crânio analisada. Na região de sutura palatina e região retro molar houve alteração da expressão dos genes analisados ($p < 0,05$) e na região de côndilo houve alteração apenas da expressão do RUNX2 na amostra de 45 ($p > 0,05$). Estudos futuros são necessários para analisar a quantificação de proteínas expressas nos sítios ósseos analisados.

É possível supor que, ocorra um mecanismo de compensação molecular após a supressão da testosterona aumentando e diminuindo a transcrição de genes relacionados à osteogênese e homeostase óssea, o que corrobora com outros estudos (Handelsman *et al.*, 1987; Verdonck; De Ridder; Verbeke *et al.*, 1998). Mais estudos devem ser feitos para aprofundar e compreender estes sinais transcricionais da osteogênese para a formação e manutenção óssea.

Uma limitação deste estudo foi não mensurar os níveis sorológicos de testosterona durante a puberdade para confirmar a supressão deste hormônio. Entretanto, autores como Idris (2012) e Yarrow *et al.* (2008) destacam a segurança da orquiectomia como procedimento capaz de promover a redução de 99,0% do nível de testosterona em ratos, medida importante tanto para comprovar a eficácia da orquiectomia quanto para comparar os resultados com o desenvolvimento craniofacial. Segundo Nassar e Leslie (2024), andrógenos produzidos na porção reticular das glândulas suprarrenais podem se ligar aos receptores de testosterona. Esta limitação também oportuniza novos estudos que permitirão inferir se é aconselhável realizar a análise sorológica do paciente antes do início do tratamento ortodôntico, com o objetivo de definir os valores dos níveis de testosterona e o quanto este nível pode influenciar diretamente na resposta do paciente frente ao tratamento.

Nosso estudo apoia a hipótese de que as avaliações da supressão de testosterona contribuem para esclarecer a importância dos hormônios na etiologia das maloclusões. Já é sabido que os hormônios fazem parte da complexa rede de interação

molecular que está envolvida com o crescimento ósseo e cartilaginoso (Omori *et al.*, 2020). Estudos futuros em humanos devem ser sugeridos, de modo a mensurar os níveis sorológicos de testosterona durante a puberdade e correlacionar com o crescimento craniofacial.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo nos mostra que a supressão de testosterona, no período puberal dos ratos, altera as medidas cefalométricas de forma diferente de acordo com a região do crânio e o tipo de osso, o que resulta em alterações no crescimento e desenvolvimento craniofacial. Os resultados também permitem inferir que a supressão de testosterona parece promover modificações mais significativas na direção do crescimento ósseo do que no tamanho e na qualidade do osso. Além disso, há um desbalanceamento na expressão dos genes relacionados a formação óssea, o que também varia de acordo com a região analisada. A supressão da testosterona parece estimular um mecanismo compensatório na expressão dos genes relacionados ao desenvolvimento ósseo.

REFERÊNCIAS

- BAIRD, E.; TAYLOR, G. X-ray micro computed-tomography. **Curr Biol**, v. 27, n. 8, p. R289-r291, 2017.
- BERGAMO, A. Z. N. *et al.* Estrogen deficiency during puberty affects the expression of microRNA 30a and microRNA 503 in the mandibular condyle. **Ann Anat**, v. 240, p. 151865, 2022.
- BIGA, L. *et al.* **Anatomy & Physiology**. Oregon State Open Educational Resources, 2019. ISBN 9781955101158. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=Ofu7zgEACAAJ>.
- BIRD, B. M. *et al.* Does the facial width-to-height ratio map onto variability in men's testosterone concentrations? **Evolution and Human Behavior**, v. 37, n. 5, p. 392-398, 2016.
- BOULEFTOUR, W. *et al.* Deletion of OPN in BSP knockout mice does not correct bone hypomineralization but results in high bone turnover. **Bone**, v. 120, p. 411-422, 2019.
- BOUXSEIN, M. L. *et al.* Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **J Bone Miner Res**, v. 25, n. 7, p. 1468-86, 2010.
- BROWN, R. E. Social and hormonal factors influencing infanticide and its suppression in adult male Long-Evans rats (*Rattus norvegicus*). **J Comp Psychol**, v. 100, n. 2, p. 155-61, 1986.
- CHAN, W. C. W.; TAN, Z. Regulation and Role of Transcription Factors in Osteogenesis. v. 22, n. 11, 2021.
- CHIN, K.-Y.; IMA-NIRWANA, S. The effects of orchidectomy and supraphysiological testosterone administration on trabecular bone structure and gene expression in rats. **The Aging Male**, v. 18, n. 1, p. 60-66, 2015.
- CORTE, G. M. *et al.* Cephalometric studies of the mandible, its masticatory muscles and vasculature of growing Göttingen Minipigs-A comparative anatomical study to refine experimental mandibular surgery. **PLoS One**, v. 14, n. 4, p. e0215875, 2019.
- CRAY, J. J., JR. *et al.* The effects of testosterone on craniosynostotic calvarial cells: a test of the gene/environmental model of craniofacial anomalies. **Orthod Craniofac Res**, v. 14, n. 3, p. 149-55, 2011.
- CUIJPERS, V. *et al.* Resolution, sensitivity, and *in vivo* application of high-resolution computed tomography for titanium-coated polymethyl methacrylate (PMMA) dental implants. **Clin Oral Implants Res**, v. 25, n. 3, p. 359-365, 2014.
- DA COSTA, K. J. R. *et al.* Testosterone improves the osteogenic potential of a composite in vitro and *in vivo*. **Cell Tissue Res**, v. 376, n. 2, p. 221-231, 2019.

DAVID, K. *et al.* Über krystallinisches männliches Hormon aus Hoden (Testosteron), wirksamer als aus Harn oder aus Cholesterin bereitetes Androsteron. **Biological Chemistry**, v. 233, n. 5-6, p. 281-283, 1935.

DE TONI, L. *et al.* **Osteocalcin, a bone-derived hormone with important andrological implications. Andrology 5 (4): 664–670** 2017.

DOMANDER, R.; FELDER, A. A.; DOUBE, M. BoneJ2 - refactoring established research software, v. 6, p. 37, 2021.

ELIAS, L. S. *et al.* Markers of bone remodeling in neoplastic and bone-related lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 110, n. 5, p. 624-31, 2010.

ELZENATY, R. N.; DUTOIT, T.; FLÜCK, C. E. Basics of androgen synthesis and action. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 36, n. 4, p. 101665, 2022.

FAJARDO, R. J.; RYAN, T. M.; KAPPELMAN, J. Assessing the accuracy of high-resolution X-ray computed tomography of primate trabecular bone by comparisons with histological sections. **Am J Phys Anthropol**, v. 118, n. 1, p. 1-10, 2002.

FULLER, H.; FULLER, R.; PEREIRA, R. M. R. Tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução para avaliação de parâmetros morfológicos e funcionais ósseos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 4, p. 352-362, 2015.

FUJITA, T. *et al.* Influence of sex hormone disturbances on the internal structure of the mandible in newborn mice. **Eur J Orthod**, v. 28, n. 2, p. 190-4, 2006.

FUJITA, T. *et al.* Effects of sex hormone disturbances on craniofacial growth in newborn mice. **J Dent Res**, v. 83, n. 3, p. 250-4, 2004.

GARCIA, E. K. GUIA DE PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E DE DOSES EM ROEDORES DE LABORATÓRIO. 2021.

GIBBS, R. A. *et al.* Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. **Nature**, v. 428, n. 6982, p. 493-521, 2004.

GREEN, M. R. *et al.* Age-dependent regulation by androgens of gene expression in the anterior hypothalamus and stress-induced release of adrenal hormones in adolescent and adult male rats. v. 31, n. 6, p. e12714, 2019.

HANDELSMAN, D. J. History of androgens and androgen action. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 36, n. 4, p. 101629, 2022.

HANDELSMAN, D. J. *et al.* Hormonal regulation of the peripubertal surge of insulin-like growth factor-I in the rat. **Endocrinology**, v. 120, n. 2, p. 491-6, 1987.

HENTZ, L. L. S.; NOGUEIRA, W. A. Fatores externos e/ou ambientais que interferem no crescimento e desenvolvimento craniofacial. **Journal of Multidisciplinary Dentistry**, v. 13, n. 1, p. 70-7, 2023.

HODGES-SIMEON, C. R. *et al.* Facial Width-To-Height Ratio (fWHR) Is Not Associated with Adolescent Testosterone Levels. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153083, 2016.

IDRIS, A. I. Ovariectomy/orchidectomy in rodents. In: (Ed.). **Bone research protocols**: Springer, 2012. p.545-551.

JIANG, L. *et al.* The Effect of MMP-2 Inhibitor 1 on Osteogenesis and Angiogenesis During Bone Regeneration. **Front Cell Dev Biol**, v. 8, p. 596783, 2020.

JOPEK, K. *et al.* Transcriptome Profile of Rat Adrenal Evoked by Gonadectomy and Testosterone or Estradiol Replacement. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 8, p. 26, 2017.

KANATANI, N. *et al.* Cbfb β regulates Runx2 function isoform-dependently in postnatal bone development. **Developmental biology**, v. 296, n. 1, p. 48-61, 2006.

KHOSLA, S.; MONROE, D. G. Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 8, n. 1, 2018.

KHOSWANTO, C. Role of matrix metalloproteinases in bone regeneration: Narrative review. **J Oral Biol Craniofac Res**, v. 13, n. 5, p. 539-543, 2023.

KODAMA, N. *et al.* A local bone anabolic effect of rhFGF2-impregnated gelatin hydrogel by promoting cell proliferation and coordinating osteoblastic differentiation. **Bone**, v. 44, n. 4, p. 699-707, 2009.

KOMORI, T. Functions of Osteocalcin in Bone, Pancreas, Testis, and Muscle. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 20, 2020.

KOMORI, T. Whole Aspect of Runx2 Functions in Skeletal Development. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 10, 2022.

KOOLHAAS, J. M. **The laboratory rat**. In: Hubrecht R, Kirkwood J (eds) **The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals**, 1st edn. John Wiley & Sons, West Sussex. p.311–326. 2010

KÜCHLER, E. C. *et al.* Effects of estrogen deficiency during puberty on maxillary and mandibular growth and associated gene expression—an μ CT study on rats. **Head & face medicine**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2021.

KÜCHLER, E. C. *et al.* Estrogen deficiency affects tooth formation and gene expression in the odontogenic region of female rats. **Ann Anat**, v. 236, p. 151702, 2021.

KUSTRO, T. *et al.* Quantification of the mandibular defect healing by micro-CT morphometric analysis in rats. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 46, n. 12, p. 2203-2213, 2018.

LARA-CASTILLO, N. Estrogen Signaling in Bone. **Applied Sciences**, v. 11, n. 10, p. 4439, 2021.

LEE, V. W. *et al.* Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. **J Reprod Fertil**, v. 42, n. 1, p. 121-6, 1975.

LEFEVRE, C. E. *et al.* Telling facial metrics: facial width is associated with testosterone levels in men. **Evolution and Human Behavior**, v. 34, n. 4, p. 273-279, 2013.

LI, X. *et al.* Increased RANK ligand in bone marrow of orchietomized rats and prevention of their bone loss by the RANK ligand inhibitor osteoprotegerin. **Bone**, v. 45, n. 4, p. 669-676, 2009.

LIM, K. E. *et al.* Core binding factor β of osteoblasts maintains cortical bone mass via stabilization of Runx2 in mice. **J Bone Miner Res**, v. 30, n. 4, p. 715-22, 2015.

MACARI, S. *et al.* Lactation induces increases in the RANK/RANKL/OPG system in maxillary bone. **Bone**, v. 110, p. 160-169, 2018.

MANLOVE, A. E.; ROMEO, G.; VENUGOPALAN, S. R. Craniofacial Growth: Current Theories and Influence on Management. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 32, n. 2, p. 167-175, 2020.

MANOLAGAS, S. C.; KOUSTENI, S.; JILKA, R. L. Sex steroids and bone. **Recent Prog Horm Res**, v. 57, p. 385-409, 2002.

MÁRQUEZ HERNÁNDEZ, R. A. *et al.* Sex hormones receptors play a crucial role in the control of femoral and mandibular growth in newborn mice. **Eur J Orthod**, v. 33, n. 5, p. 564-9, 2011.

MARTÍN-FERNÁNDEZ, M. *et al.* Comparative study of the effects of osteoprotegerin and testosterone on bone quality in male orchidectomised rats. **Aging Male**, v. 23, n. 3, p. 189-201, 2020.

MARYA, A.; VENUGOPAL, A.; VAID, N. Opções de tratamento ortodôntico em paciente com variante genética extremamente rara de displasia cleidocraniana. **Clinical Orthodontics**, v. 21, n. 2, 2022.

MIOT, H. A. Sample size in clinical and experimental trials. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 10, p. 275-278, 2011.

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

NAKAMURA, Y. *et al.* Low dose fibroblast growth factor-2 (FGF-2) enhances bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)-induced ectopic bone formation in mice. **Bone**, v. 36, n. 3, p. 399-407, 2005.

NASSAR, G. N.; LESLIE, S. W. Physiology, Testosterone. In: (Ed.). **StatPearls**. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Stephen Leslie declares no relevant financial relationships with ineligible companies.: StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC., 2024.

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

OTTO, G. M.; FRANKLIN, C. L.; CLIFFORD, C. B. Biology and diseases of rats. In: (Ed.). **Laboratory animal medicine**: Elsevier, 2015. p.151-207.

PERILLO, L. *et al.* Comparison between rapid and mixed maxillary expansion through an assessment of dento-skeletal effects on posteroanterior cephalometry. **Prog Orthod**, v. 15, n. 1, p. 46, 2014.

PERRY, R. J.; FARQUHARSON, C.; AHMED, S. F. The role of sex steroids in controlling pubertal growth. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 68, n. 1, p. 4-15, 2008.

PHILLIP, M. *et al.* Testosterone stimulates growth of tibial epiphyseal growth plate and insulin-like growth factor-1 receptor abundance in hypophysectomized and castrated rats. **Endocrine**, v. 16, n. 1, p. 1-6, 2001.

PREMKUMAR, S.; GURUMURTHY, B. Assessment of 2D:4D in subjects with anteroposterior mandibular dysplasia. **J Contemp Dent Pract**, v. 14, n. 4, p. 582-5, 2013.

PRITCHETT-CORNING, K. R. *et al.* Principles of rodent surgery for the new surgeon. **J Vis Exp**, v. 47, p. e2586, 2011.

QUEIROZ, P. *et al.* MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA: PRINCÍPIOS DE FUNCIONAMENTO E UTILIZAÇÃO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, p. 1073-1091, 2019.

REIS, C. L. B. *et al.* Testosterone suppression impacts craniofacial growth structures during puberty : An animal study. **J Orofac Orthop**, 2022.

REN, S. G. *et al.* Direct administration of testosterone increases rat tibial epiphyseal growth plate width. **Acta Endocrinol (Copenh)**, v. 121, n. 3, p. 401-5, 1989.

SAKANO, S. *et al.* Inhibitory effect of bFGF on endochondral heterotopic ossification. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 293, n. 2, p. 680-685, 2002.

SALHOTRA, A. *et al.* Mechanisms of bone development and repair. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 21, n. 11, p. 696-711, 2020.

SALONIA, A. *et al.* Paediatric and adult-onset male hypogonadism. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 38, 2019.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Quantitative PCR. **CSH Protoc**, v. 2006, n. 1, 2006.

SCHAFRUM MACEDO, A.; CEZARETTI FEITOSA, C. Animal modeling in bone research-Should we follow the White Rabbit?, v. 2, n. 3, p. 162-168, 2019.

SCHINDELIN, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676-682, 2012.

SHERRIER, M. *et al.* 2 - Ultrasound Basics. In: WILLIAMS, C. J.; SUSSMAN, W. L., *et al.* (Ed.). **Atlas of Interventional Orthopedics Procedures**: Elsevier, 2022. p.14-30. ISBN 978-0-323-75514-6.

SI, J. *et al.* Osteopontin in Bone Metabolism and Bone Diseases. **Med Sci Monit**, v. 26, p. e919159, 2020.

SILVA, A. *et al.* **ANÁLISE MICROESTRUTURAL ÓSSEA TRABECULAR 2D E 3D POR MICROTOMOGRÁFIA TRIDIMENSIONAL: UMA COMPARAÇÃO DE MODELOS GEOMÉTRICOS.** 2010.

SOBUE, T. *et al.* Over-expression of fibroblast growth factor-2 causes defective bone mineralization and osteopenia in transgenic mice. **Journal of cellular biochemistry**, v. 95, n. 1, p. 83-94, 2005.

TAKEMOTO, G. *et al.* Meclozine Attenuates the MARK Pathway in Mammalian Chondrocytes and Ameliorates FGF2-Induced Bone Hyperossification in Larval Zebrafish. **Front Cell Dev Biol**, v. 9, p. 694018, 2021.

TOKUHARA, C. K. *et al.* Updating the role of matrix metalloproteinases in mineralized tissue and related diseases. **Journal of Applied Oral Science**, v. 27, p. e20180596, 2019.

TUNHEIM, E. G.; SKALLEVOLD, H. E.; ROKAYA, D. Role of hormones in bone remodeling in the craniofacial complex: A review. **J Oral Biol Craniofac Res**, v. 13, n. 2, p. 210-217, 2023.

TURNER, R. T. *et al.* Differential effects of gonadal function on bone histomorphometry in male and female rats. **J Bone Miner Res**, v. 4, n. 4, p. 557-63, 1989.

TURNER, R. T.; WAKLEY, G. K.; HANNON, K. S. Differential effects of androgens on cortical bone histomorphometry in gonadectomized male and female rats. **J Orthop Res**, v. 8, n. 4, p. 612-7, 1990.

UMOH, J. U. *et al.* *In vivo* micro-CT analysis of bone remodeling in a rat calvarial defect model. **Phys Med Biol**, v. 54, n. 7, p. 2147-61, 2009.

VANCEA, A.; SERBAN, O.; FODOR, D. Relationship between Osteopontin and Bone Mineral Density. **Acta Endocrinol (Buchar)**, v. 17, n. 4, p. 509-516, 2021.

VANDENPUT, L. *et al.* Role of the androgen receptor in skeletal homeostasis: the androgen-resistant testicular feminized male mouse model. **J Bone Miner Res**, v. 19, n. 9, p. 1462-70, 2004.

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

VERDONCK, A. *et al.* Effect of testosterone replacement after neonatal castration on craniofacial growth in rats. **Arch Oral Biol**, v. 43, n. 7, p. 551-7, 1998.

VERDONCK, A. *et al.* Comparative effects of neonatal and prepubertal castration on craniofacial growth in rats. **Arch Oral Biol**, v. 43, n. 11, p. 861-71, 1998.

VERDONCK, A. *et al.* Effect of low-dose testosterone treatment on craniofacial growth in boys with delayed puberty. **Eur J Orthod**, v. 21, n. 2, p. 137-43, 1999.

WANG, Q. *et al.* The mandibles of castrated male rhesus macaques (*Macaca mulatta*): The effects of orchidectomy on bone and teeth. **Am J Phys Anthropol**, v. 159, n. 1, p. 31-51, 2016.

WEI, X. *et al.* Postnatal Craniofacial Skeletal Development of Female C57BL/6NCrl Mice. **Front Physiol**, v. 8, p. 697, 2017.

WELKER, K. M.; BIRD, B. M.; ARNOCKY, S. Commentary: Facial Width -to-Height Ratio (fWHR) Is Not Associated with Adolescent Testosterone Levels. **Frontiers in Psychology**, v. 7, 2016.

WEN, X. *et al.* FGF2 positively regulates osteoclastogenesis via activating the ERK-CREB pathway. **Arch Biochem Biophys**, v. 727, p. 109348, 2022.

WHITEHOUSE, A. J. *et al.* Prenatal testosterone exposure is related to sexually dimorphic facial morphology in adulthood. **Proc Biol Sci**, v. 282, n. 1816, p. 20151351, 2015.

WOLFF, R. B. *et al.* Aspectos moleculares dos esteroides sexuais sobre a cartilagem e os ossos. **Revista da Associação médica brasileira**, v. 58, p. 493-497, 2012.

WU, J. *et al.* Androgen receptor SUMOylation regulates bone mass in male mice. **Mol Cell Endocrinol**, v. 479, p. 117-122, 2019.

YAO, Z.; GETTING, S. J.; LOCKE, I. C. Regulation of TNF-Induced Osteoclast Differentiation. **Cells**, v. 11, n. 1, 2021.

YARROW, J. F. *et al.* Supraphysiological testosterone enanthate administration prevents bone loss and augments bone strength in gonadectomized male and female rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 295, n. 5, p. E1213-E1222, 2008.

YU, K. *et al.* Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth. 2003.

ZAHRA, F. *et al.* Clinical Spectrum and Causes of Delayed Puberty Among Patients Presenting to the Endocrine Clinic at Jinnah Postgraduate Medical Centre. **Cureus**, v. 14, n. 1, p. e21574, 2022.

ZHANG, J. *et al.* FGF2: a key regulator augmenting tendon-to-bone healing and cartilage repair. **Regenerative Medicine**, v. 15, n. 9, p. 2129-2142, 2020.

ZHANG, M. F.; LIU, Q.; JIA, G. X. Reference gene selection for gene expression studies in lily using quantitative real-time PCR. **Genet Mol Res**, v. 15, n. 2, 2016.

ZUCHA, D.; KUBISTA, M.; VALIHRACH, L. Tutorial: Guidelines for Single-Cell RT-qPCR. v. 10, n. 10, 2021.

ZUNG, A. *et al.* Testosterone effect on growth and growth mediators of the GH-IGF-I axis in the liver and epiphyseal growth plate of juvenile rats. **J Mol Endocrinol**, v. 23, n. 2, p. 209-21, 1999.

ANEXO A – CERTIFICADO CEUA



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

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

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

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

Alfenas, 05 de Julho de 2019.

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