



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Odontológicas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000 Telefax:
(35) 3299-1067



CAIO LUIZ BITENCOURT REIS

**INFLUÊNCIA DA TESTOSTERONA NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO
CRANIOFACIAL DE RATOS**

Alfenas/MG

2020

CAIO LUIZ BITENCOURT REIS

INFLUÊNCIA DA TESTOSTERONA NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO
CRANIOFACIAL DE RATOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas-MG.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Silva Barroso de Oliveira
Coorientadora: Profa. Dra. Erika Calvano Küchler

Alfenas/MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

R785i Reis, Caio Luiz Bitencourt
Influência da testosterona no crescimento e desenvolvimento
craniofacial de ratos / Caio Luiz Bitencourt Reis – Alfenas, MG, 2020.
68 f.: il. –

Orientadora: Daniela Silva Barroso de Oliveira.
Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológica) – Universidade
Federal de Alfenas, 2020.
Bibliografia.

1. Ortodontia. 2. Testosterona. 3. Desenvolvimento Maxilofacial.
I. Oliveira, Daniela Silva Barroso de. II. Título.

CDD- 617.64

Ficha Catalográfica elaborada por Marlom Cesar da Silva
Bibliotecário-Documentalista CRB6/2735

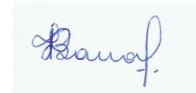
CAIO LUIZ BITENCOURT REIS

**INFLUÊNCIA DA TESTOSTERONA NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO
CRANIOFACIAL DE RATOS**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas-MG.

Aprovada em: 22/12/2020

Profa. Dra. Daniela Silva Barroso de Oliveira
Instituição: Universidade Federal de Alfenas Assinatura:



Profa. Dra. Marina Lara de Carli
Instituição: Universidade Federal de Alfenas Assinatura:



Profa. Dra. Livia Azeredo Alves Antunes
Instituição: Universidade Federal Fluminense Assinatura:



Dedico este trabalho a José Sales Alvim,
exemplo de cristão, servo de todos. Grande líder
e amigo. Seu trabalho nesta terra ainda renderá
muitos frutos.

AGRADECIMENTOS

Primeiro, ao Grande Mestre, minha inspiração diária. Seguir Seus passos nunca é penoso e seus ensinamentos fazem bem para a alma. Por Ele e para Ele vivo.

Minha amada noiva, Izabella Fernandes, responsável pelos meus dias mais felizes e refúgio para meus dias mais intrincados. Aquela que me conhece até mais do que eu mesmo e, independente da situação, exala amor e confiança, mesmo em momentos em que eu não mereço. Com certeza sua pessoa constrói a minha, dia após dia.

Meu pai, Luiz Mauro dos Reis, minha mãe, Regina Bitencourt Reis, minha irmã e cunhado, Carolina Bitencourt e Rodrigo Fernandes. Esses dias de júbilo só fazem sentido quando estamos juntos, pois devo a vocês grande gratidão pela parceria, preocupação e apoio genuíno. Sempre se lembrem que jamais esquecerei de cada cuidado e empenho promovidos por vocês durante minha caminhada.

Meus sogros e minha cunhada, gratidão pela preocupação diária em todas as áreas e aspectos de minha jornada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Daniela Silva Barroso de Oliveira, a grande precursora e promotora dos meus primeiros passos na ciência. Agradeço pelo zelo e persistência em tornar este e outros eventos importantíssimos possíveis.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Erika Calvano Küchler, que expressa excepcional parceria e empreendedorismo em minha carreira. Sou grato pelo desenvolvimento de cada aspecto pertinente à minha evolução e a de toda equipe de pesquisa.

Aos colaboradores desta pesquisa, que de forma tão complacente abraçaram esta causa e cederam seu espaço, tempo e fomento para que este estudo se realizasse. Aos Profs. Drs. Tomaz Henrique Araújo, Wagner Costa Rossi Junior, Alessandra Esteves, Livia Antunes, Leonardo Antunes, Bernadete Stuani, Roberto Lourenço e Christian Kirschneck. Aos técnicos, Wagner Corsini, Pertrus Marques, Andrea Mendonça, Fernando Ponciano, Moacyr Clemente, Itamar Dias e Adenildes Ferreira.

Agradeço também professores e discentes que promoveram e participaram de trabalhos significativos para meu desenvolvimento como mestre. Aos Profs. Drs. Mirian Matsumoto, Daniela Lima, Flares Baratto, João Brancher, Rafaela Scariot,

Isabela Madalena e Carmen Storrer. Aos discentes, Mariane Barbosa, Magali Madureira, Fábio Quintino, Lucas Rodrigues e Caio Cunha.

Agradeço ao Programa de Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas, promotor do meu desenvolvimento e título de Mestre.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo fomento pessoal.

Enfim, agradeço aos meus familiares, amigos e comunidade pelo companheirismo.

RESUMO

O estudo da influência da supressão de testosterona corrobora para o avanço no entendimento da etiologia das maloclusões. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da supressão de testosterona sobre o crescimento e desenvolvimento craniofacial de ratos. Trinta e seis ratos da linhagem Wistar foram selecionados para este estudo. Orquiectomia (ORX) foi realizada nos animais do grupo experimental (n=18) e cirurgia sham nos animais do grupo controle (n=18) no 23º dia de vida. Os animais foram alocados em 4 grupos: um grupo ORX (n=9) e um grupo sham (n=9) eutanasiados aos 45 dias de vida, e o outro grupo ORX (n=9) e o outro sham (n=9) eutanasiados aos 73 dias de vida. Tomadas radiográficas laterais do crânio foram realizadas em todos os animais nos 23º, 45º e 73º dia de vida. Medidas cefalométricas e o peso corporal foram obtidos e comparados pelo teste t de Student ou Mann-Whitney pelo software GraphPad Prism. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Após eutanásia dos grupos, o côndilo mandibular, a sutura pré-maxilar e a sutura palatina mediana foram processadas para análise histológica qualitativa de cortes sagitais e frontais corados em Hematoxilina e Eosina e Picrosírius e Hematoxilina. As imagens foram obtidas em microscopia de luz convencional e luz polarizada. O peso corporal foi estatisticamente menor nos grupos ORX ($p < 0,05$). Medidas cefalométricas verticais e horizontais foram menores nos grupos ORX. O comprimento do osso nasal, a altura craniana anterior, a altura mandibular e as medidas cefalométricas entre os pontos 3-5 e 21-23 foram estatisticamente menores nos grupos ORX em ambos os tempos experimentais. Ângulos cefalométricos também foram estatisticamente diferentes nos grupos ORX. As análises histológicas demonstram uma redução da diferenciação de células precursoras de condroblastos no côndilo mandibular em animais orquiectomizados, além de menor proliferação de osteoblastos e formação de trabéculas ósseas. Há maior concentração de fibras colágenas nos grupos *Sham* em comparação aos grupos ORX no côndilo mandibular, e fibras colágenas do tipo III foram observadas apenas nos grupos *Sham*. Na sutura palatina mediana, foi observada maior proliferação de células precursoras de osteoblastos em animais do grupo controle. Fibras colágenas tipo III também foram observadas apenas nos grupos *Sham*. Não foi observado diferenças significativas na sutura pré-maxilar. Conclui-se que a supressão de testosterona diminui o crescimento craniofacial de ratos durante a puberdade

Palavras-chave: Ortodontia. Testosterona. Desenvolvimento Maxilofacial

ABSTRACT

The aim of this study was evaluating the testosterone suppression impact on craniofacial growth in rats. Thirty-six *Wistar* rats were included in this study. Orchiectomy (ORX) was performed in experimental group (n=8), while *sham* surgery was performed in control group (n=18) with 23 days old. The animals were allocated in 4 groups: an ORX group (n=9) and a *sham* group (n=9) euthanized with 45 days old and an ORX group (n=9) and a *sham* group (n=9) euthanized with 73 days old. Radiographic Lateral Cephalograms were performed on all animals with 23, 45 and 73 days old. Cephalometric measurements were obtained and compared with t-student and Mann-Whitney tests performed with GraphPad Prism software. The $p < 0,05$ values were statistically different. After euthanasia of the groups, the mandibular condyle, the pre-maxillary suture and the middle palatal suture were processed for qualitative histological analysis of sagittal and frontal sections stained in Hematoxylin and Eosina and Picrosírius and Hematoxylin. The images were obtained using conventional light microscopy and polarized light. Body weight was lower in ORX groups. Verticals and horizontals cephalometric measurements were lower in ORX groups. Cephalometric angles were also statistically different in ORX groups. Histological analyzes demonstrate a reduction in the differentiation of chondroblast precursor cells in the mandibular condyle in orchiectomized animals, in addition to the lower proliferation of osteoblasts and formation of bone trabeculae. There is a higher concentration of collagen fibers in the Sham groups compared to the ORX groups in the mandibular condyle, and type III collagen fibers were observed only in the Sham groups. In the median palatine suture, greater proliferation of osteoblast precursor cells was observed in animals of the control group. Type III collagen fibers were also observed only in the Sham groups. There were no significant differences in the premaxillary suture. Concludes that the testosterone suppression decreases the craniofacial growth during puberty of rats.

Keywords: Orthodontic. Testosterone. Craniofacial growth

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Divisão entre os grupos experimentais	24
Figura 2 - Cirurgia Orquiectomia	26
Figura 3 - Cefalostato	27
Figura 4 - Pontos cefalométricos	28
Figura 5 - Número de perda de animais por grupo	34
Figura 6 - Taxas de crescimento em medidas estatisticamente significantes	39
Figura 7 - Côndilo Mandibular em HE	41
Figura 8 - Disco Epifisário do Côndilo Mandibular corado em HE	42
Figura 9 - Sutura Palatina Mediana aos 45 dias em HE	43
Figura 10 - Sutura Palatina Mediana aos 73 dias em HE	44
Figura 11 - Sutura Pré-Maxilar em HE	45
Figura 12 - Côndilo Mandibular corado em Picrosírius aos 45 dias	46
Figura 13 - Côndilo Mandibular corado em Picrosírius aos 73 dias	47
Figura 14 - Sutura Palatina Mediana corada em Picrosírius aos 45 dias	48
Figura 15 - Sutura Palatina Mediana corada em Picrosírius aos 73 dias	49
Figura 16 - Sutura Pré-Maxilar corada em Picrosírius aos 45 dias	50
Figura 17 - Sutura Pré-Maxilar corada em Picrosírius aos 73 dias	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Resumo dos estudos que avaliaram o crescimento craniofacial após supressão de testosterona em ratos	19
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pontos Cefalométricos	29
Tabela 2 - Medidas Cefalométricas.....	30
Tabela 3 - Comparação das médias de peso entre os grupos	34
Tabela 4 - Comparação das medidas iniciais entre os grupos (23 ^o dia).....	36
Tabela 5 - Comparação das medidas entre os grupos ao 45 ^o dia.....	37
Tabela 6 - Comparação das medidas entre os grupos ao 73 ^o dia.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Receptor de Andrógeno
BMD	Densidade Mineral Óssea
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
DP	Desvio Padrão
DXA	Densitometria por emissão de raios x de dupla energia
GH	Hormônio do Crescimento
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1
LH	Hormônio Luteinizante
OPG	Osteoprotegerina
PTH	Hormônio da Paratireoide
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-B
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-B
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas
VDR	Receptor de Vitamina-D

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3	OBJETIVOS.....	22
3.1	OBJETIVO GERAL.....	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4	METODOLOGIA.....	23
4.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	23
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	24
4.3	ANIMAIS.....	24
4.4	CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO E ALOCAÇÃO.....	24
4.5	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	25
4.6	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	25
4.6.1	Orquiectomia.....	26
4.6.2	Cirurgia Sham.....	26
4.7	ANÁLISE CEFALOMÉTRICA EM IMAGENS RADIOGRÁFICAS.....	26
4.8	EUTANÁSIA.....	32
4.9	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	32
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5	RESULTADOS.....	35
5.1	MEDIDAS CEFALOMÉTRICAS.....	36
5.2	IMAGENS HISTOLÓGICAS.....	36
5.2.1	Cortes corados em Hematoxilina e Eosina.....	36
5.2.2	Cortes corados em Picrosírius e Hematoxilina.....	41
6	DISCUSSÃO.....	53
7	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58
	ANEXO A – GUIDELINE PREPARE.....	64
	ANEXO B – FERRAMENTA SYRCLE’S	66
	ANEXO C – CHECK-LIST ARRIVE.....	67
	ANEXO D – CERTIFICADO CEUA.....	69

1 INTRODUÇÃO

O crescimento e desenvolvimento craniofacial humano, bem como suas anormalidades, estão intrinsicamente ligados com os níveis de hormônios do crescimento, hormônios tireoidianos e esteroides sexuais. Influências ambientais e fatores congênitos desregulam os níveis desses hormônios e afetam o desenvolvimento das estruturas de crescimento do complexo craniofacial (CRAY JR. *et al.*, 2011).

A testosterona desempenha uma função crucial durante o crescimento e desenvolvimento esquelético, particularmente durante a puberdade de meninos (CLARKE; KHOSLA, 2009; VANDERSCHUEREN *et al.*, 2014). Autores afirmam que a testosterona estimula direta ou indiretamente a diferenciação e proliferação de osteoclastos, osteoblastos e condroblastos através de receptores de andrógenos (AR) em células indiferenciadas e maduras durante os processos de crescimento sutural e endocondral. No entanto, a testosterona apresenta comportamento específico para cada célula, região óssea e tipo de crescimento, que ainda permanecem em investigação (CLARKE; KHOSLA, 2009; FUJITA *et al.*, 2006; MANOLAGAS *et al.*, 2013; MOHAMAD *et al.*, 2016; VANDERSCHUEREN *et al.*, 2014; VENKEN *et al.*, 2009; VERDONCK *et al.*, 1998a; WU *et al.*, 2019a; WU *et al.*, 2019b).

Condições genéticas ou adquiridas durante a puberdade podem diminuir os níveis sorológicos de testosterona e impactar o desenvolvimento esquelético do indivíduo (MOHAMAD *et al.*, 2016; SALONIA *et al.*, 2019). Alguns estudos demonstram que as medidas craniofaciais estão correlacionadas com os níveis de testosterona em homens (LEFEVRE *et al.*, 2013; PENTON-VOAK; CHEN, 2004; VERDONCK *et al.*, 1999; WHITEHOUSE *et al.*, 2015). No entanto, outros autores 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; HODGES-SIMEON *et al.*, 2016). Além disso, as estruturas de crescimento craniofaciais também reagem de modo diferente conforme o momento pelo qual o indivíduo sofre de baixos níveis de testosterona (VERDONCK *et al.*, 1998a; WHITEHOUSE *et al.*, 2015).

Em uma revisão por Mohamad *et al.* (2016), os autores defendem que a experimentação animal para supressão de testosterona amplia o conhecimento sobre

o papel da testosterona no crescimento e desenvolvimento ósseo humano. Os autores também afirmam que a técnica mais comum e mais segura para a supressão em animais continua sendo a orquiectomia, apesar da castração química emergir na literatura. Ratos e camundongos são os animais mais utilizados para estudos ósseos devido à sua proximidade com a fisiologia humana (GIBBS *et al.*, 2004; MACEDO *et al.*, 2019).

Estudos que suprimiram os níveis de testosterona em animais no período pré-puberal relataram uma inibição no desenvolvimento de algumas estruturas do complexo craniofacial (FUJITA *et al.*, 2004; 2006; NODA *et al.*, 1994; VERDONCK *et al.*, 1998a; 1998b). No entanto, é necessário que mais estudos nessa perspectiva sejam realizados com métodos de análises mais modernos e completos, para concluir com propriedade e clareza quanto a influência da testosterona no crescimento do complexo craniofacial, bem como, em um futuro próximo, estabelecer protocolos e condutas ao cirurgião-dentista, tanto para indicação de reposição hormonal quanto para postura frente ao tratamento ortodôntico de pacientes que se submeteram à reposição. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da supressão de testosterona sobre o crescimento do complexo craniofacial em animais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O crescimento ósseo do complexo craniofacial ocorre por dois tipos de mecanismos. São eles o tipo intramembranoso, que ocorre nas suturas da maxila e demais ossos do crânio, e endocondral ou cartilaginoso, que ocorre nas sincondroses da base craniana, da mandíbula e no côndilo mandibular. O crescimento intramembranoso é caracterizado pela diferenciação direta de células mesenquimais em osteoblastos, células específicas de deposição de matriz óssea. As suturas ósseas são centros de crescimento intramembranoso, que consiste em uma membrana de tecido conjuntivo periosteal que divide as duas massas ósseas. Esta membrana é formada por células pré-osteoblásticas que se diferenciam em osteoblastos maduros e iniciam a deposição de matriz óssea, que, posteriormente, será mineralizada. Os osteoblastos confinados nesta matriz se tornam osteócitos (BIGA *et al.*, 2020; FERGUSON *et al.*, 2015; PINZAN *et al.*, 2010).

Já o crescimento endocondral inicia-se a partir de uma placa ou disco epifisário, que é o local de diferenciação e proliferação de condroblastos nas extremidades do osso. Condroblastos são células que depositam matriz cartilaginosa, que se tornam condrócitos uma vez aprisionadas por essa matriz. Posteriormente à mineralização desta matriz, os condrócitos entram em apoptose e capilares sanguíneos e células pré-osteoblásticas invadem o espaço deixado pelos condrócitos que se diferenciam em osteoblastos maduros e depositam matriz óssea sobre os restos da matriz cartilaginosa (BIGA *et al.*, 2020; FERGUSON *et al.*, 2015; JUNQUEIRA, 2013; PINZAN *et al.*, 2010).

O processo de crescimento tanto sutural quanto endocondral depende de uma rede de interações biomoleculares complexa, que envolve a interação de hormônios, mediadores de crescimento e receptores membranosos. Os hormônios e seus respectivos receptores mais estudados no campo do crescimento craniofacial são os que possuem ação direta sobre a diferenciação e proliferação celular esquelética, como o Hormônio do Crescimento (GH), o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1 (IGF-1), a família das Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs) entre outros. No entanto, hormônios que não possuem impacto direto ou que possuem efeitos principais diferentes do crescimento esquelético também são citados na literatura como componentes cruciais desta rede biomolecular de crescimento, como o Hormônio da Paratireoide (PTH), o Receptor de Vitamina-D (VDR) e, também, os

hormônios sexuais, sendo o estrógeno prevalente nas mulheres e a testosterona prevalente nos homens (KÜCHLER *et al.*, 2020; OMORI *et al.*, 2020).

Cerca de 95% da testosterona secretada no organismo masculino é produzida pelo testículo, e o restante produzida pelas glândulas adrenais (VANDERSCHUEREN *et al.*, 2014). Através do Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) regulado pelo Hipotálamo, a Hipófise estimula a produção do Hormônio Luteinizante (LH), que ativa diretamente a produção de testosterona pelas células Intersticiais nos testículos (MOHAMAD *et al.*, 2016). Estudos indicam que a molécula biotransformada da testosterona, 5 α -diidrotestosterona, possui maior afinidade pelos ARs de algumas células como musculares, cerebrais e ósseas (LABRIE *et al.*, 2009). As principais células ósseas, como osteoblasto, osteoclasto, osteócitos, condroblastos e condrócitos possuem os receptores ARs, bem como suas células precursoras. A testosterona tem um papel direto na diferenciação e proliferação destas células, impactando a homeostasia do crescimento esquelético (MANOLAGAS *et al.*, 2013; MOHAMAD *et al.*, 2016; VANDERSCHUEREN *et al.*, 2014). No entanto, o mecanismo molecular entre AR e o crescimento ósseo ainda é inconclusivo. Alguns estudos sugerem que o receptor está diretamente envolvido na regulação do número de osteoclastos através de sinalizações ainda desconhecidas (WU *et al.*, 2019a). O receptor seria também responsável pela regulação de apoptose sofrida pelos osteoblastos (KOUSTENI *et al.*, 2002; MOHAMAD *et al.*, 2016).

Apesar da testosterona influenciar o crescimento craniofacial desde a gestação do indivíduo, o hormônio tem maiores impactos sobre o crescimento esquelético no período da puberdade (CLARKE; KHOSLA, 2009; MANOLAGAS *et al.*, 2013; (VANDERSCHUEREN *et al.*, 2014). Neste período, outros hormônios que também estão envolvidos no crescimento ósseo são citados na literatura por serem diretamente influenciados pela testosterona, como o GH, IGF-1, Interleucina (IL)-6, PTH, dentre outros (CLARKE; KHOSLA, 2009). O GH e IGF-1 são os mais estudados juntos à testosterona. Ambos os hormônios são regulados pelos níveis sorológicos de testosterona, e pesquisadores sugerem que a queda de níveis de testosterona também gera queda destes hormônios, que pode promover uma desregulação no processo de crescimento e remodelação óssea (EDEN, 1979; HANDELSMAN *et al.*, 1987; LEE *et al.*, 1975; MOHAMAD *et al.*, 2016). No entanto, essa interação entre testosterona, GH e IGF-1 ainda não é completamente esclarecida (FITTS *et al.*, 2013).

A deficiência de testosterona é mais comumente observada durante a adolescência de meninos, mesmo que esta tenha sido instalada na infância. Esta condição é nomeada como Hipogonadismo, que pode ser dividido em primário ou secundário. O Hipogonadismo Primário corresponde à 7% dos casos de deficiência de testosterona, e é caracterizado pela disfunção dos testículos, que pode ser causado por condições congênitas, como síndrome de Down, ou por condições adquiridas, como trauma, doenças renais e pulmonares, HIV e rádio ou quimioterapia. Já o Hipogonadismo Secundário é caracterizado pela disfunção do Hipotálamo e/ou Hipófise, causado por origens orgânicas, sendo idiopáticas ou congênitas, ou por causas adquiridas, como trauma, infecções, diabetes mellitus tipo 2, uso de glicocorticóides e opioides, obesidade ou desnutrição e exercícios físicos em excesso. O Hipogonadismo Secundário por causas adquiridas corresponde a 60% dos casos de deficiência de testosterona, enquanto por causas orgânicas, 10%. O Hipogonadismo funcional, que é caracterizado por defeitos tanto nos testículos quanto no hipotálamo e hipófise, corresponde à 20% dos casos (SALONIA *et al.*, 2019). Estima-se que a prevalência mundial de hipogonadismo durante a adolescência seja de 7,7% (VISWANATHAN; EUGSTER, 2011).

A inibição do crescimento ósseo e a perda de volume ósseo são considerados os desfechos mais significativos do hipogonadismo (CLARKE; KHOSLA, 2009). A deficiência de andrógeno acelera o *turnover* ósseo e causa um desbalanceamento entre reabsorção e remodelação óssea (LEROUXEL *et al.*, 2004). Este processo ocorre devido a diminuição de diferenciação de pré-osteoblastos em osteoblastos maduros e devido ao aumento da secreção do Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-B (RANKL) pelos pré-osteoblastos em comparação à secreção de osteoprotegerina (OPG) pelos osteoblastos maduros. O RANKL e OPG competem pelo receptor RANK em células pré-osteoclásticas, e, quando o RANKL prevalece, há estímulo da diferenciação e proliferação de osteoclastos maduros, resultando em perda óssea (CLARKE; KHOSLA, 2009). Os efeitos e mecanismos da deficiência de andrógeno sobre as células condrogênicas foram pouco estudados. Sugere-se que a testosterona também inibe a diferenciação de pré-condroblastos em condroblastos maduros (FUJITA *et al.*, 2006; KAPUR; REDDI, 1989).

A relação entre baixos níveis de testosterona e o crescimento craniofacial em humanos ainda foi pouco explorada. Verdonck *et al.* (1999) foram os primeiros a relatarem a função da testosterona sobre o crescimento craniofacial após comparar

medidas cefalométricas de meninos diagnosticados com hipogonadismo antes e após 1 ano de tratamento com andrógenos. Estudos posteriores que avaliaram pacientes saudáveis revelam que níveis sorológicos de testosterona estão correlacionados positivamente com algumas medidas faciais, indicando que o impacto de baixos níveis de testosterona sobre o complexo craniofacial não é exclusivo de pacientes portadores de hipogonadismo (LEFEVRE *et al.*, 2013; PENTON-VOAK; CHEN, 2004; WHITEHOUSE *et al.*, 2015). Entretanto, estes estudos se limitaram em avaliar a face através do método *face-width-to-lower-height ratio*, que seria a proporção entre altura e largura facial, mais utilizada para mensurar a masculinização e estética facial, e não o crescimento craniofacial, pois não se avalia o crânio inteiro. Dois estudos recentes não observaram esta mesma correlação entre testosterona e proporção facial (BIRD *et al.*, 2016; HODGES-SIMEON *et al.*, 2016). Importantes divergências destes estudos, como os diferentes momentos de mensuração dos níveis de testosterona e medidas craniofaciais e avaliação de apenas uma parte do crânio não permitem uma conclusão apurada sobre a relação entre testosterona e medidas craniofaciais em humanos.

Estudos com animais (QUADRO 1) procuram esclarecer a relação entre a testosterona e o complexo craniofacial e indicar algumas particularidades desta relação, como o impacto da supressão de testosterona antes, durante e depois da puberdade, além de elucidar a respeito das diferentes sensibilidades entre os tipos de crescimento intramembranoso e endocondral, entre os diferentes ossos do crânio, entre as diferentes células ósseas e cartilaginosas e entre as direções de crescimento frente à supressão de testosterona (FUJITA *et al.*, 1998; 2001a; 2001b; 2004; 2006; LEROUXEL *et al.*, 2004; MÁRQUEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2011; VERDONCK *et al.*, 1998a; 1998b).

Verdonck *et al.* (1998a) e Fujita *et al.* (2001b), concordam ao relatar que o crescimento intramembranoso parece ser mais afetado pela supressão de testosterona do que o crescimento endocondral. Além disso, os autores observaram alteração significativa na densidade mineral na porção trabecular da mandíbula, mas não observaram alterações significativas na porção cortical quando avaliaram a espessura do côndilo, onde ocorre o crescimento endocondral. No entanto, Fujita *et al.* (2006), observaram diferença significativa tanto na porção de crescimento endocondral quanto na porção de crescimento intramembranoso na mandíbula. O estudo também observou uma diminuição da densidade mineral nas porções trabecular e cortical. Márquez Hernandez *et al.* (2011) realizaram imuno-histoquímica

Quadro 1 – Resumo dos estudos que avaliaram o crescimento craniofacial após supressão de testosterona em ratos.

Autor/Ano	Momento de Supressão	Análises Realizadas	Resultados
Verdonck (1998) "A"	Logo após ao nascer	a) Análise Cefalométrica	O crescimento sutural é mais afetado pela supressão de testosterona do que o crescimento endocondral
Verdonck (1998) "B"	Logo após ao nascer	a) Análise Cefalométrica	Os crescimentos sutural e endocondral são igualmente afetados pela supressão de testosterona.
Fujita (1998)	60 dias de vida	a) Análise Histológica do Côndilo	Volume trabecular ósseo foi diminuído pela supressão de testosterona.
Fujita (2001) "A"	60 dias de vida	a) Análise Histológica do Côndilo	Volume trabecular ósseo foi diminuído pela supressão de testosterona.
Fujita (2001) "B"	60 dias de vida	a) Análise Histológica do Côndilo	A largura do côndilo é afetada pela supressão
Lerouxel (2004)	Logo após ao nascer	a) Densitometria por emissão de raios x de dupla energia (DXA)	A supressão induz a perda óssea alveolar e a diminuição da Densidade Mineral Óssea (BMD)
Fujita (2004)	5 dias de vida	a) Análise Cefalométrica	A supressão de Testosterona inibe o crescimento craniofacial
Fujita (2006)	5 dias de vida	a) Análise histológica da mandíbula	A supressão de Testosterona inibe o crescimento da mandíbula
Márquez-Hernández (2011)	5 dias de vida	a) Análise Cefalométrica b) Imunohistoquímica	A supressão de Testosterona inibe a expressão de AR no côndilo mandibular

Fonte: Do autor (2020)

para marcação de AR apenas na porção condilar da mandíbula, sem estabelecer parâmetros com a região de crescimento intramembranoso da mandíbula, o que dificulta concluir a questão sobre as diferentes sensibilidades dos locais de crescimento mandibular.

A densidade mineral e óssea das porções trabecular e cortical do osso aparentemente são sensíveis à manutenção homeostática do AR concomitantemente com os níveis sorológicos de testosterona disponíveis no sangue (WU *et al.*, 2019b). No entanto, alguns autores discordam sobre a influência dos AR sob a porção cortical óssea, relatando não haver diferenças entre os grupos controle e grupos com supressão de testosterona na experimentação animal (MANOLAGAS *et al.*, 2013). Venken *et al.* (2009) sustentam a ideia de que o crescimento do osso trabecular não é sensível ou é minimamente sensível aos hormônios GH e IGF-1. Assim, a supressão

de testosterona afetaria diretamente o osso trabecular. Já o osso cortical seria mais sensível ao GH e IGF-1. Assim, estudos futuros devem esclarecer se a testosterona possui um papel no osso cortical ou se a supressão de testosterona causaria um efeito rebote nos hormônios GH e IGF-1 para recompensar a ausência de testosterona.

Colágeno é o principal componente orgânico secretado pelos osteoblastos e está contido tanto no periósteo quanto na matriz óssea. Ele modula a formação óssea e a mineralização do tecido, interferindo diretamente na diferenciação de osteoblastos e inibição de osteoclastos (PORFÍRIO; FANARO, 2016). Um recente estudo demonstrou que a síntese de fibras colágenas também parece sofrer impacto após a supressão de testosterona (ARAI *et al.*, 2017). Os mecanismos biomoleculares desta interação ainda não foram esclarecidos, tampouco estudos em odontologia.

É necessário inferir alguns vieses entre os estudos que suprimiram a testosterona em animais para avaliarem sua influência sobre o crescimento craniofacial. Alguns estudos não seguiram o período recomendado para se realizar a orquiectomia de ratos no período prépuberal, que é entre os dias 21 a 25 (LEE *et al.*, 1975). Além disso, orquiectomia logo após o nascimento não é recomendada por conta do risco de mortalidade neonatal. É recomendando realizar orquiectomia com pelo menos 5 dias de vida para avaliar a supressão de testosterona na infância (MÁRQUEZ HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

Muitos artigos não descrevem dados quantitativos das medidas lineares. Informações detalhadas são necessárias para se realizar uma conclusão mais apurada de cada medida e estabelecer parâmetros para futuros estudos. Os efeitos da supressão de testosterona precisam ser investigados também na maxila. Apenas um estudo comparou medidas cefalométricas entre o grupo controle e o grupo orquiectomizado (FUJITA *et al.*, 2004). Além disso, análises modernas, como microtomografia e imuno-histoquímica, devem ser realizadas para promover discussões mais consistentes a respeito da temática. Finalmente, os mecanismos biomoleculares envolvidos nesse processo também precisam ser investigados para explanar a respeito de prováveis sinais mediados pelo AR para a manutenção do número de osteoclastos no osso.

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram os seguintes:

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo é realizar uma investigação em animais a fim de avaliar o papel da deficiência de testosterona nas alterações do crescimento e desenvolvimento craniofacial

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar as alterações fenotípicas da maxila e da mandíbula em modelo animal com deficiência de testosterona durante a puberdade;
- b) Comparar as medidas cefalométricas através de raio-x dos ratos orquiectomizados e dos *sham* operados em dois tempos experimentais;
- c) Comparar cortes histológicos das regiões de crescimento da sutura da pré-maxila, sutura palatina mediana e do côndilo mandibular corados com Hematoxilina e Eosina e Picrosírius.

4 METODOLOGIA

O guideline PREPARE (Planning Research and Experimental Procedures on Animals: Recommendations for Excellence) (SMITH *et al.*, 2018) (ANEXO A) e a ferramenta SYRCLE'S (HOOIJMANS *et al.*, 2014) (ANEXO B) foram utilizadas para o desenho deste estudo. Como recomendado, uma revisão sistemática foi realizada a respeito do tema para estabelecer, com base na literatura, os desfechos para este estudo. Para a escrita científica desta dissertação, o guideline ARRIVE (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments) foi seguido (KILKENNY *et al.*, 2010) (ANEXO C).

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 na qual aprovou este projeto sob número de protocolo 024/2019 conforme anexo (ANEXO D). Duas veterinárias foram consultadas previamente para esclarecimento de todos os aspectos pertinentes ao bem estar animal, bem como medicações e posologia.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi utilizada uma fórmula segundo Miot (2011) para o cálculo de tamanho de amostra para comparação de uma hipótese em dois grupos ou mais, que se segue:

$$n^P = \left(\frac{\left(\frac{Z\alpha}{2} + Z\beta \right) * Sd}{D} \right)^2$$

Sendo:

- a) n^P : Tamanho da amostra;
- b) $Z\alpha/2$: valor padronizado para 1,96 para um nível de significância de 95%;
- c) $Z\beta$: Valor padronizado para 1,282 para o erro tipo II em estudos na saúde (ENG, 2003);
- d) Sd : desvio padrão da diferença dos pares;

e) \bar{D} : Média da diferença entre os pares.

Para preencher os valores de Sd e D , Miot (2011) orienta obter resultados de estudos pilotos ou já publicados para estabelecer os parâmetros de um mínimo significativo de animais necessários. Dessa forma, foi utilizado como base um artigo recentemente publicado que avaliou o papel do estrógeno no desenvolvimento craniofacial, realizado pela mesma equipe de trabalho na Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (OMORI *et al.*, 2020). Os resultados significantes desse estudo permitiram obter o valor de 0,89 para Sd e 0,63 para D . Assim, ao aplicar os valores na fórmula, obtemos o resultado de 7 animais por grupo. Após a orquiectomia, os animais poderiam sofrer de hipotermia e infecções decorrentes da cirurgia e cerca de 20% deles poderão vir a óbito decorrente dessas complicações (IDRIS, 2012; PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2011). Por isso, fez-se necessário acrescentar mais dois animais por grupo, totalizando 9 animais por grupo (n=36).

4.3 ANIMAIS

Rattus norvegicus machos da linhagem *Wistar* heterogênicos foram selecionados para este estudo. Esta espécie é bem aceita em pesquisas ósseas devido ao seu nível de proximidade com a fisiologia humana (GIBBS *et al.*, 2004; MACEDO *et al.*, 2019). 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 mesma instituição.

4.4 CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO E ALIMENTAÇÃO

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno de dimensões de 49x34x16cm forradas com maravalha. Três ratos permaneceram em cada caixa com livre acesso a ração e água filtrada. A temperatura do ambiente era controlada entre 21° a 23° celsius com exaustão do ar. Os animais permaneciam em um ciclo de 12 horas claro-escuro. Os animais não foram aleatoriamente alojados para evitar lesões por mordedura pós-orquiectomia (BROWN, 1986; CENTRAL MICHIGAN UNIVERSITY, 2013; KOOLHAAS, 2010).

4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Trinta e seis animais foram aleatoriamente alocados com um sorteio simples (“cara ou coroa”) por um pesquisador em 4 grupos, sendo 2 grupos experimentais e 2 grupos controle (FIGURA 1). Orquiectomia foi o procedimento realizado nos dois grupos experimentais aos 23 dias de vida. Cirurgia *sham* foi realizada nos dois grupos controle também aos 23 dias de vida para fins de ajuste de fatores de confusão, neste caso, o estresse cirúrgico, síntese de tecido mole, anestesia e analgésico. Animais de um grupo experimental e de um grupo controle foram eutanasiados aos 45 dias de vida, e os outros dois grupos restantes foram eutanasiados aos 73 dias.

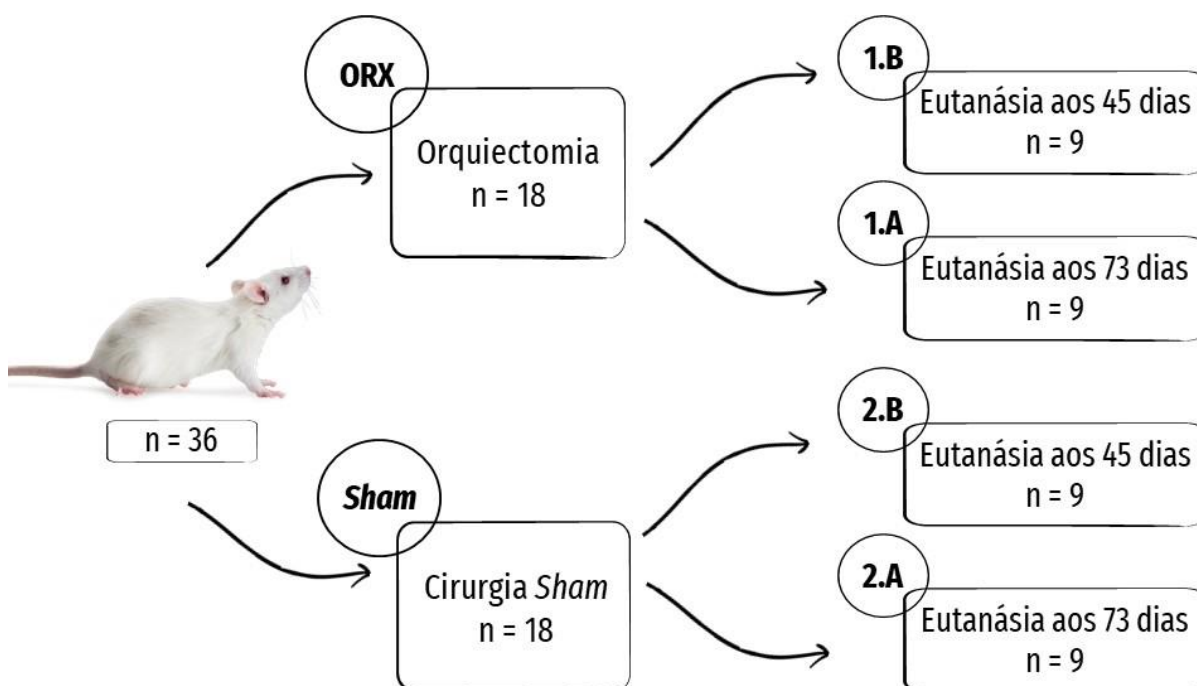


Figura 1 - Fluxograma de alocação de animais
Fonte: Do autor (2020)

4.6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para a supressão de testosterona, o procedimento no grupo experimental foi a orquiectomia, que é a remoção dos dois testículos e epidídimos. A orquiectomia é o método mais seguro e eficaz para a supressão de testosterona, que demonstra afetar diretamente os níveis sorológicos desse hormônio durante a puberdade (FUJITA *et al.*, 2004; MOHAMAD *et al.*, 2016; VERDONCK *et al.*, 1998a; 1998b). O grupo controle recebeu uma cirurgia *sham*, ou fictícia. Um único operador previamente treinado por

veterinária e que não participou do processo de alocação dos animais realizou os procedimentos.

4.6.1 Orquiectomia

Em ratos *Wistar* machos, a descida dos testículos ocorre próximo ao 15º dia de vida, e a puberdade se inicia aproximadamente no 35º dia (OTTO *et al.*, 2015). Segundo Lee *et al.*, (1975), a partir do 26º dia de vida, em média, já ocorre uma discreta, mas significativa, produção de testosterona pelos testículos. Sendo assim, a orquiectomia foi realizada no 23º dia de vida do animal. 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). A orquiectomia foi realizada conforme protocolado por Idris (2012) (FIGURA 2). Primeiramente, limpeza e antissepsia da região cirúrgica foi realizada com solução de PVPI 10%. Uma incisão em cada lado do escroto foi realizada com lâmina de bisturi até a exposição dos testículos. 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 reinsertado no escroto, e a síntese do tecido mole foi realizada com adesivo a base de cianoacrilato. Após a cirurgia, foi administrado Tramadol (12,5 mg/kg intramuscular) para analgesia pós-cirúrgica, de 12h/12h por um dia. Os ratos foram observados durante esse período.

4.6.2 Cirurgia Sham

Os animais do grupo controle foram submetidos a cirurgias fictícias (*sham*), onde os testículos foram apenas movimentados e devolvidos intactos à posição original. A incisão e síntese dos tecidos, bem como anestesia e analgesia, também foram reproduzidas neste grupo.

4.7 ANÁLISE CEFALOMÉTRICA EM IMAGENS RADIOGRÁFICAS

Todos os animais foram submetidos a duas tomadas radiográficas. A primeira tomada radiográfica foi ao 23º dia de vida, no dia da cirurgia, como *baseline*. Todos

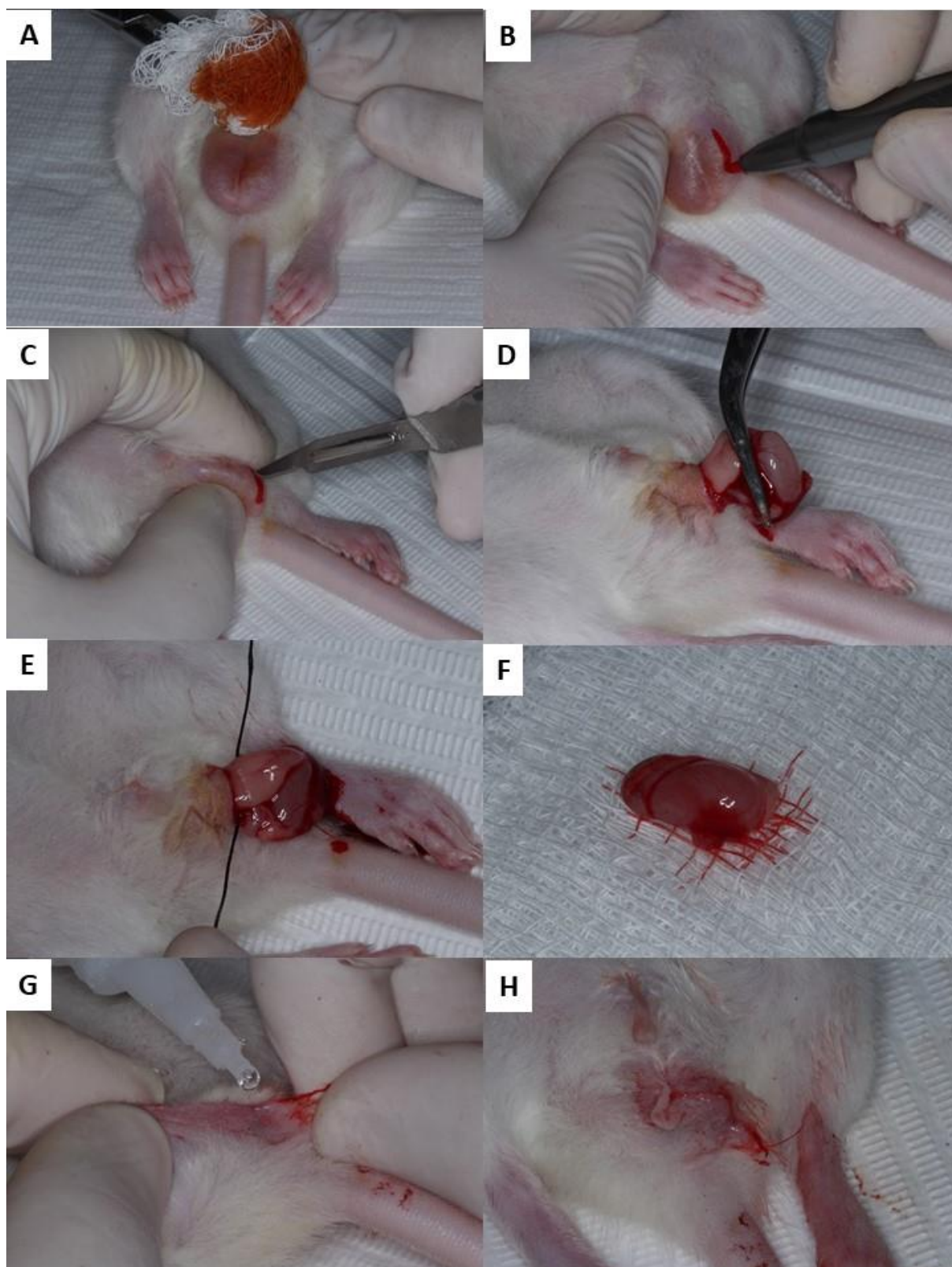


Figura 2 - Sequência da Orquiectomia.

Fonte: Do autor (2020).

Legenda: A) Antissepsia. B) Linha de orientação à incisão. C) Incisão. D) Extravasamento do conteúdo escrotal. E) Ligadura do funículo espermático. F) Testículo e epidídimos removidos. G) Síntese do tecido mole. H) Aspecto Final.

os grupos foram radiografados neste dia. A outra tomada radiográfica foi realizada no último dia de vida dos animais, que, dependendo do grupo, foi no 45º dia ou no 73º dia de vida. Todos os animais estavam sob efeito anestésico para a realização das tomadas radiográficas.

As tomadas radiográficas foram realizadas de acordo com protocolo publicado por Omori *et al.*, (2020). Um cefalostato próprio para roedores foi confeccionado com o intuito de estabilizar a cabeça firmemente através de um par de hastes inserido nas orelhas (FIGURA 3). Radiografia lateral foi obtida através de filmes oclusais *Insight Oclusal FE Speed* (Kodak Insight, FE Speed, Eastman Kodak Company) que estavam a uma distância foco-objeto fixa de 12cm dos raio-x. Um segmento de 10 mm de fio ortodôntico foi inserido junto à película para fins de escala. Utilizou-se um aparelho de raios-x Spectro 70X (Dabi Atlante Indústrias Médico Odontológicas Ltda) e a exposição foi realizada com padrões de voltagem de 8 mA, 70 Kvp, e tempo de exposição de 0,8 segundos.

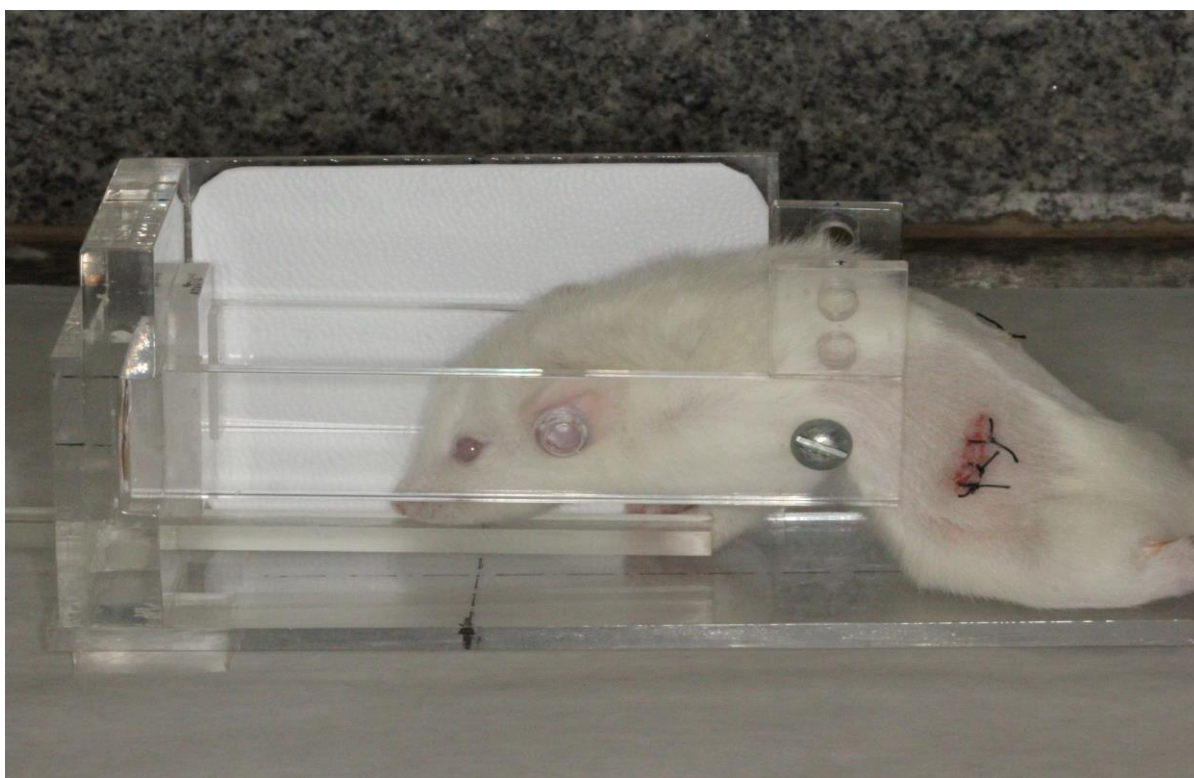


Figura 3 – Cefalostato
Fonte: OMORI *et al.*, 2020.

As radiografias foram digitalmente escaneadas e analisadas pelo software ImageJ (Wayne Rasband National Institutes of Health, EUA). Um único avaliador foi calibrado pelo Coeficiente de Correlação Intraclasse (ICC). O número de radiografias

e de medidas necessárias para calibração foram obtidas pelo software PASS 2020 (NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA), e o teste ICC foi realizado pelo software IBM SPSS Versão 23.0 (IBM Corp. Released Armonk, New York, USA) com radiografias que foram aleatoriamente escolhidas com auxílio do Microsoft Excel. Após calibração (ICC = 0,76), o avaliador inseriu pontos cefalométricos nas radiografias (FIGURA 4; TABELA 1) e as medidas cefalométricas foram obtidas (TABELA 2). O avaliador estava cego para os grupos em todas as etapas.

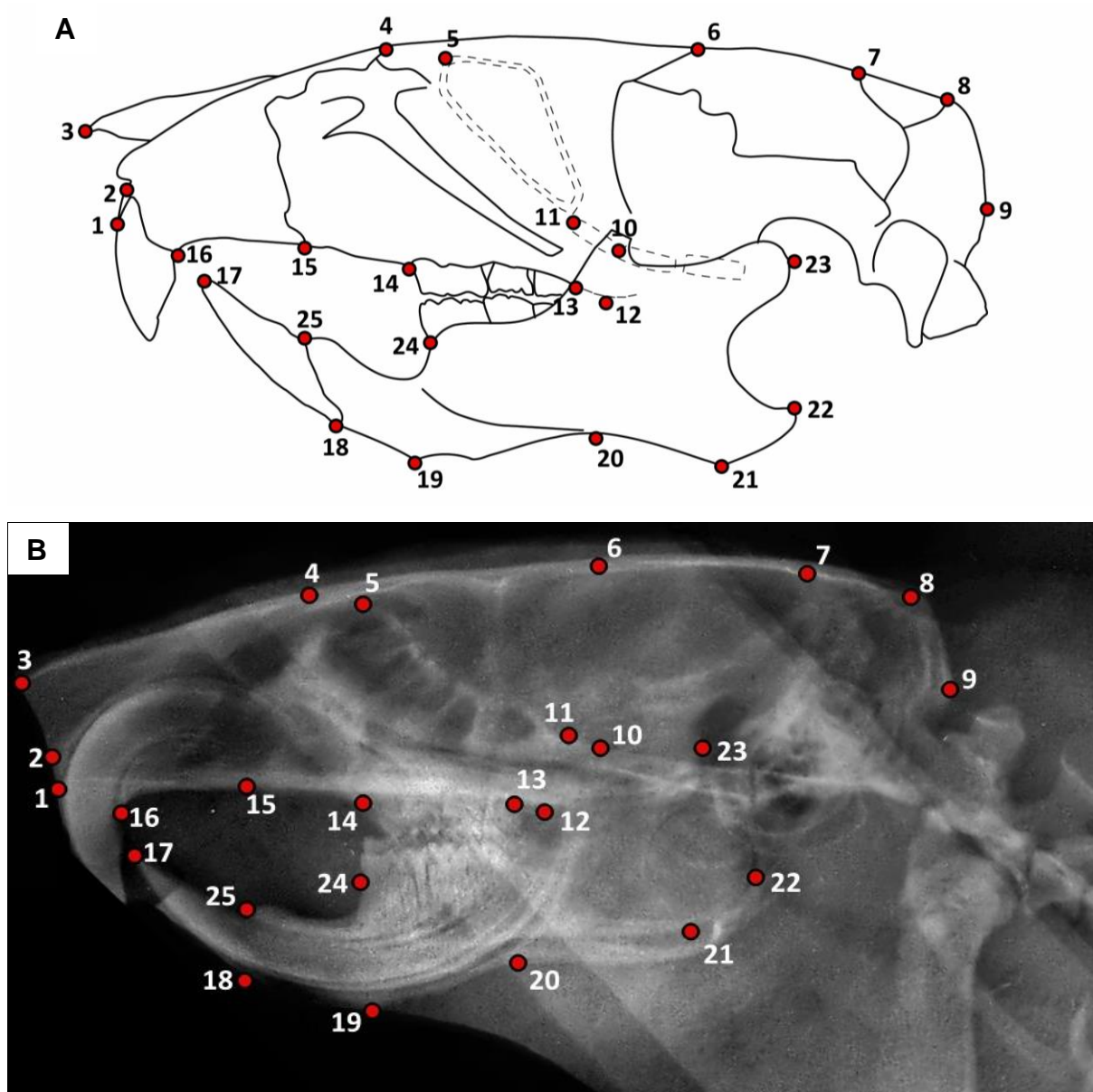


Figura 4 – Pontos cefalométricos.

Fonte: Do autor (2020)

Legenda: A: Desenho da radiografia lateral e pontos cefalométricos. B: Marcação de pontos cefalométricos no software ImageJ.

Tabela 1 - Pontos cefalométricos

Ponto	Descrição	Autor(es)
1	Ponto mais ântero-inferior do processo alveolar da pré-maxila. (Ponto "Prosthion")	Kiliaridis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
2	Ponto mais anterior do alvéolo do incisivo superior (Ponto A).	Wei <i>et al.</i> , (2017).
3	Ponto rostral do osso nasal.	Kiliaridis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004); Wei <i>et al.</i> , (2017).
4	Ponto mais anterior da sutura fronto-nasal (Ponto Násio)	Kiliaridis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004); Wei <i>et al.</i> , (2017).
5	Intersecção entre o osso frontal e o ponto mais ântero-superior. do limite posterior do osso etmoide.	Kiliaridis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004); Wei <i>et al.</i> , (2017).
6	Intersecção entre os ossos frontal e parietal.	Wei <i>et al.</i> , (2017).
7	Intersecção entre o osso parietal e a porção anterior do osso interparietal.	Wei <i>et al.</i> , (2017).
8	Intersecção entre o osso interparietal e a porção escamosa do osso occipital.	Kiliaridis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004); Wei <i>et al.</i> , (2017).
9	Ponto médio da margem posterior do forame Magnum.	Wei <i>et al.</i> , (2017).
10	Ponto mais ventral da sincondrose interesfenoide.	Wei <i>et al.</i> , (2017).
11	Ponto rostral do osso pré-esfenóide.	Wei <i>et al.</i> , (2017).
12	Ponto mais caudal do osso da porção palatina da maxila.	Wei <i>et al.</i> , (2017).
13	Intersecção entre o osso da maxila e a porção distal do terceiro molar superior.	Kiliaridis <i>et al.</i> , (1985)
14	Intersecção entre a maxila e a porção mesial do primeiro molar superior.	Kiliaridis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004); Wei <i>et al.</i> , (2017).
15	Intersecção entre a maxila e a pré-maxila.	Wei <i>et al.</i> , (2017).
16	Intersecção entre a pré-maxila e a porção lingual do incisivo superior.	Kiliaridis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004); Wei <i>et al.</i> , (2017).
17	Ponto mais proeminente entre as bordas incisais dos incisivos inferiores.	Kiliaridis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004);
18	Ponto da borda inferior no alvéolo dos incisivos inferiores.	Kiliaridis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004); Wei <i>et al.</i> , (2017).
19	Ponto mais inferior da sínfise mandibular (Ponto Gnátio)	Kiliaridis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004); Wei <i>et al.</i> , (2017).
20	Ponto mais profundo da curvatura antegonial.	Kiliaridis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004); Wei <i>et al.</i> , (2017).
21	Ponto no contorno mais inferior do processo angular da mandíbula (Ponto Gonio)	Kiliaridis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
22	Topo do ângulo mandibular	Kiliaridis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004); Wei <i>et al.</i> , (2017).
23	Ponto mais posterior do côndilo mandibular (Ponto Condílio)	Kiliaridis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004); Wei <i>et al.</i> , (2017).
24	Intersecção entre o osso alveolar e a face mesial do primeiro molar inferior	Kiliaridis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
25	Ponto da borda superior do alvéolo dos incisivos inferiores	Kiliaridis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).

Nota: Tradução para o português foi feita pelo autor.

Fonte: Do autor (2020)

Tabela 2 - Medidas Cefalométricas

(continua)

Medidas	Descrição	Autor(es)
Crânio e Maxila		
1-3	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985).
1-5	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985).
1-14	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
3-4	Comprimento do osso nasal.	Wei <i>et al.</i> , (2017).
3-5	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985).
3-9	Comprimento do Crânio	Wei <i>et al.</i> , (2017).
3-12	Comprimento da face	Wei <i>et al.</i> , (2017).
3-16	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
4-6	Comprimento do osso frontal	Wei <i>et al.</i> , (2017).
4-9	Comprimento craniano	Wei <i>et al.</i> , (2017).
4-11	Comprimento da base craniana anterior	Wei <i>et al.</i> , (2017).
4-14	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
4-15	Altura da face	Wei <i>et al.</i> , (2017).
5-8	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
5-11	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
5-13	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985).
5-14	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985).
5-16	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985).
6-7	Comprimento do osso parietal	Wei <i>et al.</i> , (2017).
6-10	Altura craniana anterior	Wei <i>et al.</i> , (2017).
7-8	Comprimento do osso interparietal	Wei <i>et al.</i> , (2017).
8-9	Comprimento do osso occipital	Wei <i>et al.</i> , (2017).
14-16	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
15-16	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985).
Mandíbula		
17-18	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
17-25	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
19-22	Comprimento da porção inferior da mandíbula	Wei <i>et al.</i> , (2017).
19-21	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
19-23	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
20-22	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985).
21-23	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
22-23	Altura Mandibular	Wei <i>et al.</i> , (2017).
23-25	Comprimento da porção superior da mandíbula	Wei <i>et al.</i> , (2017).
24-25	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
Ângulos		
2/4/25	Ângulo maxilo- mandibular	Wei <i>et al.</i> , (2017).
4/3/1	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
4/3/15	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
4/6/7	Ângulo médio anterior da abóboda craniana	Wei <i>et al.</i> , (2017).
6/7/8	Ângulo médio posterior da abóboda craniana	Wei <i>et al.</i> , (2017).
7/8/9	Ângulo posterior da abóboda craniana	Wei <i>et al.</i> , (2017).
8/5/1	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
8/5 – 3/4	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
10/4/6	Ângulo rostral da cavidade craniana	Wei <i>et al.</i> , (2017).
10/4/25	Ângulo Mandíbulo-craniano	Wei <i>et al.</i> , (2017).

Tabela 2 - Medidas Cefalométricas

		(conclusão)
Medidas	Descrição	Autor(es)
Ângulos		
12/4/3	Ângulo "Snout"	Wei <i>et al.</i> , (2017).
21/19/17	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
21/19 –	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).
23/22		
23/21/19	-	Kirialidis <i>et al.</i> , (1985); Fujita <i>et al.</i> , (2004).

Nota: As medidas com o campo "Descrição" vazias não foram nomeadas pelos autores que as idealizou. Tradução para o português foi feita pelo autor.

Fonte: Do autor (2020)

4.8 EUTANÁSIA

A eutanásia dos animais foi realizada por inalação de isoflurano. A morte do animal foi confirmada após a interrupção dos movimentos respiratórios e musculares. Para avaliar o crescimento ósseo na metade da puberdade, um grupo experimental e controle foram eutanasiados no 45º dia de vida, enquanto os outros dois grupos restantes, experimental e controle, foram eutanasiados no 73º dia de vida, para avaliar o crescimento ósseo no fim da puberdade (OTTO *et al.*, 2015).

4.9 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os animais foram escolhidos aleatoriamente para análise histológica. As hemimandíbulas e os crânios foram fixados por imersão em formol tamponado a 10% durante 24 horas em temperatura ambiente, após, as amostras foram lavadas por 4 horas em água corrente. Em seguida, as peças foram mantidas em solução de EDTA a 4,13% (pH 7,2-7,4) para desmineralização. A solução era trocada semanalmente até sua completa desmineralização, que foi verificada por meio de penetração de agulha nos tecidos.

O Côndilo Mandibular, a Sutura da Pré-Maxila e a Sutura Palatina Mediana foram submetidos ao processamento histotécnico de rotina do Laboratório do Departamento de Biologia Estrutural da UNIFAL/MG, que consistia na desidratação em soluções crescentes de álcool (70, 90 e 95%, 1 hora cada, seguido de 3 trocas em 100%, 1 hora cada), seguida da diafanização em xilol (2 trocas, 1 hora cada) e da inclusão em parafina overnight em estufa de temperatura constante de 58º.

Após o emblocamento em parafina, os blocos foram cortados em micrótomo (Leica RM2125; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) em sentido sagital (côndilo) e frontal (suturas) com 7 μm de espessura (FUJITA et al., 2006; JUNQUEIRA; MONTES, 1991). Os cortes foram distendidos e montados em lâminas silanizadas para microscopia (Objektträger – Knittel Gläser, Bielefeld, Alemanha). As lâminas foram mantidas em temperatura ambiente em posição vertical por pelo menos por 24 horas antes da coloração.

As lâminas foram desparafinizadas em 2 soluções de xilol puro durante 5 minutos cada. Após, as lâminas foram submergidas em soluções decrescentes de álcool (3 trocas de 100%, seguida de trocas de 95, 90 e 70) durante um minuto cada. As lâminas foram lavadas durante 5 minutos antes de seguir para o processo de coloração. As lâminas coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) foram submergidas durante 1 minuto em Hematoxilina e lavadas durante 5 minutos antes da imersão durante 2 minutos em eosina. As lâminas coradas em Picrosírius foram emergidas na solução durante 20 minutos, lavadas durante 5 minutos e contra coradas com Hematoxilina durante dois minutos. Em seguida, as lâminas voltaram às soluções crescentes de álcool durante 2 minutos cada e banhadas em xilol puro durante 2 minutos. As lâminas foram cobertas com lamínulas montadas com Erv-Mount.

As imagens histológicas foram obtidas em microscopia de luz (AxioPhot, Zeiss-Germany, Oberkochen, Alemanha) acoplado à câmera UCMOS Series C-mount (ToupTek Photonics Co., Ltd; Zhejiang, China) com auxílio do Software TopView versão 3.7. Filtro para luz polarizada foi inserida no microscópio para as imagens em picrosírius. As imagens foram capturadas utilizando objetiva de até 40X.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores das medidas cefalométricas foram tabulados no programa Microsoft Excel e a análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism 7.0 (San Diego, California, EUA). A normalidade na distribuição dos dados foi diagnosticada pelo teste de Shapiro-Wilk. De acordo com a distribuição dos dados, o teste t de Student ou o teste de Mann-Whitney foram utilizados para a comparação entre as médias das medidas cefalométricas. A significância estatística adotada foi de $p \leq 0.05$. A taxa de crescimento foi estabelecida subtraindo os valores das medidas que foram

estatisticamente significantes em ambos os tempos experimentais, conforme Wei *et al.*, (2017).

5 RESULTADOS

Sete animais não completaram o experimento devido às complicações na anestesia (n=5), e lesões por mordedura (n=2). A figura 5 indica o número de perda de animais por grupo.

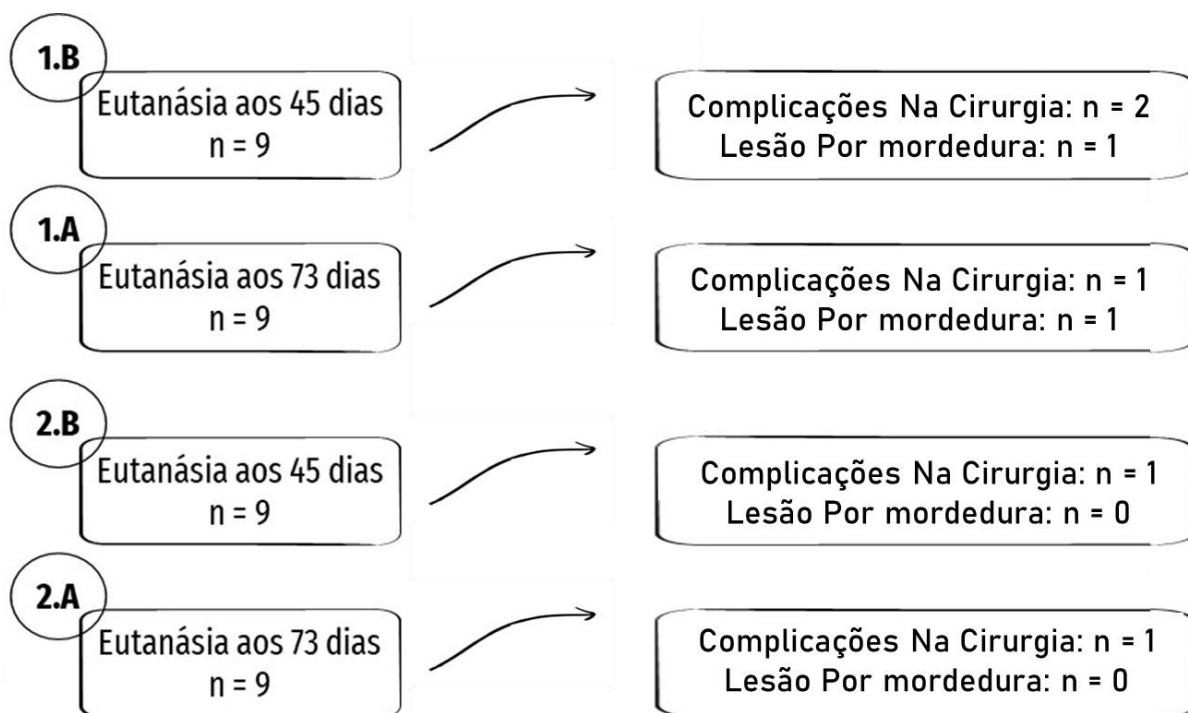


Figura 5 – Número de perda de animais por grupo
Fonte: Do autor (2020)

A média de peso dos animais estão demonstradas na tabela 3. Houve diferença estatisticamente significativa entre a média de peso final dos grupos experimentais e controle.

Tabela 3 - Comparação das médias de peso entre os grupos.

Peso em gramas	Grupos 45 dias (DP)		p	Grupos 73 dias (DP)		p
	Sham (2.B)	ORX (1.B)		Sham (2.A)	ORX (1.A)	
Inicial	80,60 (8,67)	77,88 (12,85)	0,341	79,14 (14,35)	77,88 (12,38)	0,427
Final	203,8 (7,39)	177,37 (19,33)	0,007	297,14 (28,34)	237,30 (10,88)	<0,0001

Nota: DP: Desvio Padrão. Teste t-student foi realizado. Valores em negrito indicam significância estatística.
Fonte: Do autor (2020)

5.1 MEDIDAS CEFALOMÉTRICAS

A comparação entre as médias das medidas cefalométricas iniciais (23º dia) estão na tabela 4. Algumas medidas foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

A tabela 5 demonstra a comparação entre as medidas finais entre os grupos *sham* e ORX no 45º dia de vida. O comprimento do osso nasal (3-4), comprimento do crânio (3-9), a altura da face (4-15), a altura craniana anterior (6-10) e a altura mandibular (22-23) foram estatisticamente menores no grupo ORX ($p < 0,05$), além das medidas 1-5, 3-5, 3-16, 5-14 e 21-23. O comprimento da base craniana anterior (4-11) e a medida 5-11 foram estatisticamente maiores no grupo ORX. O ângulo “snout” e o ângulo formado pela intersecção entre as linhas 8-5 e 3-4 foram maiores no grupo ORX.

A comparação entre as medidas finais entre os grupos *sham* e ORX no 73º dia de vida estão demonstradas na tabela 6. O comprimento do osso occipital (8-9) e a altura mandibular (22-23) foram estatisticamente menores no grupo ORX, além das medidas 1-3, 3-4, 3-5, 6-10, 19-21 e 21-23. Os ângulos maxilo-craniano e mandíbulo-craniano foram maiores no grupo ORX, enquanto o ângulo rostral da cavidade craniana e o ângulo formado por 23-21-19 foram menores neste grupo.

A figura 6 mostra as taxas de crescimento em gráficos das medidas que foram significativamente diferentes, tanto no tempo experimental de 43 dias quanto no tempo de 73 dias

5.2 IMAGENS HISTOLÓGICAS

As observações das imagens histológicas a seguir foram divididas por coloração.

5.2.1 – Cortes corados em Hematoxilina e Eosina

O disco epifisário do côndilo mandibular é menos espesso no grupo ORX 1.B, se comparado ao grupo *Sham* 2.B, no entanto, no grupo ORX 1.A, o disco é mais espesso, em comparação ao *Sham* 2.A. Aparentemente, há um maior número de osteoblastos e de trabéculas ósseas na zona de ossificação dos grupos *Sham* em comparação aos grupos ORX (Figura 7). A camada de células pré-condroblásticas é

Tabela 3 - Comparação das medidas iniciais entre os grupos (23º dia)

Medida	Grupos 45 dias (DP)		p	Grupos 73 dias (DP)		p
	Sham (2.B)	ORX (1.B)		Sham (2.A)	ORX (1.A)	
Crânio e Maxila						
1-3	4,61 (0,32)	4,60 (0,29)	0,965	4,87 (0,37)	5,09 (0,55)	0,390
1-5	13,83 (0,86)	14,56 (0,68)	0,157	14,43 (0,58)	15,69 (0,75)	0,004
1-14	10,92 (0,37)	11,05 (0,61)	0,657	11,43 (0,40)	11,88 (0,62)	0,124
3-4	11,00 (0,75)	10,11 (1,13)	0,131	9,95 (0,60)	11,76 (1,07)	0,002
3-5	12,98 (0,62)	13,52 (1,01)	0,281	13,09 (0,77)	14,63 (0,66)	0,003
3-9	37,08 (0,92)	36,36 (1,50)	0,326	36,94 (0,85)	38,12 (1,59)	0,101
3-12	22,16 (0,49)	22,70 (1,14)	0,288	23,04 (0,74)	23,90 (1,03)	0,095
3-16	6,52 (0,09)	6,62 (0,25)	0,365	6,73 (0,18)	6,67 (0,26)	0,590
4-6	12,27 (0,67)	12,22 (0,78)	0,913	13,48 (0,76)	12,50 (1,17)	0,081
4-9	26,71 (0,98)	26,81 (0,62)	0,855	27,50 (0,64)	27,13 (1,40)	0,527
4-11	8,90 (0,55)	10,48 (0,49)	0,001	10,45 (0,54)	10,87 (0,64)	0,210
4-14	8,89 (0,49)	8,31 (0,33)	0,059	8,55 (0,14)	9,12 (0,58)	0,029
4-15	8,62 (0,42)	8,04 (0,29)	0,032	8,15 (0,24)	8,81 (0,80)	0,058
5-8	23,53 (0,99)	22,06 (0,56)	0,025	22,99 (0,52)	22,65 (1,20)	0,497
5-11	7,53 (0,54)	8,40 (0,33)	0,018	8,27 (0,40)	8,85 (0,63)	0,057
5-13	10,12 (0,54)	10,03 (0,36)	0,768	10,37 (0,51)	10,77 (0,54)	0,182
5-14	8,82 (0,34)	8,66 (0,40)	0,467	8,50 (0,33)	9,17 (0,38)	0,004
5-16	13,15 (0,62)	14,01 (0,49)	0,035	13,81 (0,46)	14,60 (0,58)	0,015
6-7	8,70 (0,93)	8,33 (1,29)	0,575	8,86 (0,49)	8,57 (0,60)	0,347
6-10	9,85 (0,26)	9,55 (0,17)	0,059	9,69 (0,35)	9,91 (0,39)	0,292
7-8	4,23 (1,10)	5,14 (1,54)	0,257	5,16 (0,80)	5,02 (0,43)	0,713
8-9	3,61 (0,33)	4,09 (0,60)	0,110	3,75 (0,51)	4,22 (0,47)	0,107
14-16	9,02 (0,46)	9,27 (0,57)	0,786	9,56 (0,44)	9,87 (0,50)	0,240
15-16	5,53 (0,39)	5,61 (0,50)	0,886	6,01 (0,32)	6,17 (0,31)	0,362
Mandíbula						
17-18	5,02 (0,67)	5,08 (0,73)	0,474	5,68 (0,23)	5,86 (1,10)	0,668
17-25	4,25 (0,57)	4,67 (0,50)	0,516	4,71 (0,15)	5,16 (0,30)	0,003
19-22	14,60 (0,62)	14,34 (0,57)	0,140	14,23 (0,66)	15,13 (1,21)	0,105
19-21	12,99 (1,00)	12,65 (0,62)	0,470	12,88 (0,69)	13,90 (1,22)	0,073
19-23	17,25 (1,24)	16,21 (0,66)	0,454	17,44 (0,77)	17,65 (1,02)	0,676
20-22	6,95 (0,99)	6,56 (0,70)	0,877	6,14 (0,58)	6,87 (1,16)	0,152
21-23	6,88 (0,86)	6,52 (0,63)	0,132	7,98 (0,67)	7,38 (0,92)	0,185
22-23	5,41 (0,30)	5,45 (0,52)	0,600	7,01 (0,70)	6,81 (0,90)	0,651
23-25	20,30 (1,62)	18,93 (0,56)	0,890	19,86 (0,67)	20,55 (1,22)	0,205
24-25	4,72 (0,30)	4,84 (0,42)	0,485	4,88 (0,41)	5,02 (0,33)	0,526
Ângulos						
2/4/25	48,03 (1,92)	46,32 (2,85)	0,890	49,16 (2,54)	48,97 (1,60)	0,207
4/3/1	97,78 (5,73)	94,35 (4,00)	0,469	92,47 (7,92)	96,16 (8,95)	0,243
4/3/15	48,20 (2,42)	45,80 (1,87)	0,855	48,14 (2,74)	48,53 (4,52)	0,074
4/6/7	166,25 (2,10)	165,69 (2,11)	0,055	162,30 (1,38)	166,05 (4,08)	0,633
6/7/8	156,97 (2,40)	163,31 (2,54)	0,939	159,68 (4,86)	159,87 (2,86)	0,001
7/8/9	131,65 (2,20)	126,46 (4,09)	0,897	129,82 (6,52)	129,29 (7,25)	0,011
8/5/1	148,13 (1,98)	147,07 (1,66)	0,677	147,56 (0,98)	147,85 (1,36)	0,314
8/5 – 3/4	14,79 (1,71)	16,99 (2,35)	0,759	15,53 (1,94)	15,89 (1,92)	0,065
11/4/2	112,63 (2,78)	109,61 (5,42)	0,088	111,62 (3,43)	115,10 (1,94)	0,202
10/4/6	44,17 (2,67)	48,65 (8,94)	0,018	49,60 (3,42)	43,91 (3,05)	0,215
10/4/25	64,37 (2,81)	64,81 (1,63)	0,050	62,48 (2,67)	65,96 (2,50)	0,736
12/4/3	130,66 (2,03)	125,42 (5,03)	0,256	126,97 (3,68)	129,23 (1,74)	0,024
21/19/17	131,57 (2,44)	132,52 (2,82)	0,984	133,57 (4,90)	133,52 (2,53)	0,514
21/19-	103,71 (7,97)	98,97 (7,16)	0,083	107,15 (9,87)	97,04 (3,52)	0,276
23/22						
23/21/19	112,13 (7,54)	107,55 (6,15)	0,239	117,20 (8,71)	111,68 (3,73)	0,253

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

Fonte: Do autor (2020)

Tabela 4 - Comparação das medidas entre os grupos ao 45º dia

Medida	Sham (2.B)	ORX (1.B)	p
Crânio e Maxila			
1-3	5,38 (0,35)	5,30 (0,35)	0,465 [#]
1-5	18,20 (0,41)	18,04 (0,49)	0,035
1-14	13,62 (0,69)	13,74 (0,47)	0,293
3-4	14,2 (0,38)	12,99 (0,61)	0,002
3-5	18,1 (0,47)	17,3 (0,42)	0,010
3-9	43,9 (0,45)	42,8 (0,84)	0,016
3-12	26,5 (1,27)	26,7 (0,54)	0,397
3-16	7,73 (0,16)	7,54 (0,13)	0,031
4-6	14,5 (0,77)	14,9 (0,32)	0,118
4-9	30,6 (0,41)	30,9 (0,71)	0,210
4-11	8,69 (0,50)	10,1 (0,41)	0,0003
4-14	10,5 (0,49)	10,1 (0,43)	0,068
4-15	10,1 (0,85)	9,36 (0,39)	0,038
5-8	24,9 (0,91)	24,9 (0,67)	0,465 [#]
5-11	6,95 (0,43)	7,48 (0,41)	0,035
5-13	11,6 (0,73)	11,5 (0,62)	0,418
5-14	10,7 (0,43)	10,1 (0,53)	0,031
5-16	17,0 (0,63)	16,7 (0,40)	0,152
6-7	8,97 (1,11)	9,17 (0,93)	0,374
6-10	11,9 (0,73)	10,8 (0,83)	0,041[#]
7-8	5,94 (0,61)	5,85 (0,47)	0,390
8-9	4,61 (0,68)	4,37 (0,36)	0,239
14-16	11,2 (0,96)	11,2 (0,56)	0,497
15-16	6,52 (0,92)	6,83 (0,30)	0,234
Mandíbula			
17-18	9,34 (0,88)	8,41 (0,83)	0,054
17-25	5,57 (0,84)	5,43 (0,63)	0,374
19-22	17,3 (1,54)	16,8 (0,94)	0,229
19-21	15,0 (1,86)	14,7 (0,57)	0,465 [#]
19-23	21,1 (1,86)	21,0 (1,04)	0,472
20-22	9,56 (0,73)	9,37 (0,87)	0,349
21-23	11,4 (0,60)	10,2 (0,59)	0,006
22-23	9,62 (0,78)	8,19 (0,72)	0,006
23-25	21,0 (6,33)	23,5 (1,31)	0,465 [#]
24-25	5,19 (0,72)	5,41 (0,39)	0,269
Ângulos			
2/4/25	49,42 (4,77)	50,40 (2,83)	0,342
4/3/1	89,90 (5,45)	92,69 (2,04)	0,136
4/3/15	43,11 (1,98)	44,21 (0,89)	0,125
4/6/7	169,02 (4,29)	169,11 (2,59)	0,483
6/7/8	165,28 (4,23)	164,30 (1,93)	0,311
7/8/9	123,24 (8,92)	122,21 (4,64)	0,405
8/5/1	150,13 (0,87)	148,59 (1,98)	0,072
8/5 – 3/4	16,63 (0,30)	18,46 (1,83)	0,023[#]
11/4/2	108,70 (4,71)	108,86 (3,74)	0,476
10/4/6	47,86 (6,24)	45,81 (4,19)	0,265
10/4/25	59,14 (9,06)	58,14 (4,56)	0,408
12/4/3	123,04 (1,39)	125,67 (1,88)	0,014
21/19/17	131,96 (4,89)	133,44 (1,73)	0,252
21/19 – 23/22	99,82 (10,92)	105,02 (6,95)	0,273 [#]
23/21/19	110,68 (9,62)	112,35 (5,17)	0,363

Notas: DP: Desvio Padrão. Teste t-student foi realizado, exceto em medidas indicadas com #, que foram comparadas com o teste Mann-Whitney. Valores em negrito indicam significância estatística.

Fonte: Do autor (2020)

Tabela 5 - Comparação das medidas entre os grupos ao 73º dia

Medida	Sham (2.A)	ORX (1.A)	p
Crânio e Maxila			
1-3	6,12 (0,31)	5,63 (0,21)	0,003
1-5	20,63 (0,24)	20,49 (0,86)	0,373
1-14	15,62 (0,53)	15,40 (0,52)	0,239
3-4	16,79 (0,37)	15,60 (0,40)	0,0001
3-5	21,11 (0,65)	20,03 (0,75)	0,011
3-9	47,00 (1,39)	46,02 (1,03)	0,084
3-12	27,72 (0,87)	27,98 (0,99)	0,362 [#]
3-16	8,55 (0,15)	8,38 (0,33)	0,261 [#]
4-6	15,70 (0,99)	15,79 (0,81)	0,435
4-9	32,34 (1,19)	31,44 (0,96)	0,080
4-11	11,74 (0,52)	12,23 (0,96)	0,160
4-14	11,04 (0,39)	10,97 (0,30)	0,360
4-15	10,44 (0,29)	10,79 (0,41)	0,065
5-8	26,13 (1,36)	25,81 (0,83)	0,302
5-11	8,89 (0,06)	9,34 (0,61)	0,117
5-13	12,11 (0,68)	12,28 (0,54)	0,311
5-14	11,14 (0,18)	11,21 (0,38)	0,349
5-16	19,01 (0,23)	18,96 (0,89)	0,446
6-7	9,09 (1,27)	9,10 (0,44)	0,495
6-10	11,77 (0,77)	11,04 (0,46)	0,027
7-8	6,12 (0,52)	5,70 (0,66)	0,142 [#]
8-9	5,11 (0,52)	4,46 (0,37)	0,012
14-16	12,79 (0,38)	12,53 (0,42)	0,153
15-16	7,83 (0,18)	7,27 (0,73)	0,062
Mandíbula			
17-18	8,20 (0,52)	7,99 (0,81)	0,319
17-25	6,58 (0,50)	6,04 (1,19)	0,177
19-22	18,58 (0,54)	19,10 (0,69)	0,089
19-21	14,97 (0,60)	13,57 (0,53)	0,0007
19-23	22,21 (0,99)	22,44 (1,08)	0,351
20-22	10,08 (0,84)	10,58 (0,85)	0,166
21-23	12,66 (0,39)	11,89 (0,46)	0,005
22-23	10,14 (0,14)	9,04 (0,50)	0,0003
23-25	24,63 (1,08)	25,07 (1,48)	0,291
24-25	6,20 (0,53)	6,34 (0,46)	0,416 [#]
Ângulos			
2/4/25	44,24 (2,42)	43,66 (4,36)	0,395
4/3/1	89,56 (1,17)	89,53 (2,91)	0,492
4/3/15	41,54 (0,76)	42,77 (1,41)	0,052
4/6/7	171,47 (1,71)	169,78 (2,10)	0,080
6/7/8	169,24 (3,15)	167,10 (2,08)	0,085 [#]
7/8/9	118,85 (3,29)	121,55 (3,34)	0,090
8/5/1	149,75 (1,48)	149,25 (1,23)	0,262
8/5 – 3/4	16,35 (0,71)	17,91 (1,84)	0,051
11/4/2	109,62 (3,08)	113,61 (2,55)	0,013
10/4/6	45,13 (2,69)	41,26 (3,04)	0,020
10/4/25	65,41 (1,95)	70,00 (4,31)	0,024
12/4/3	120,94 (2,33)	121,70 (2,74)	0,310
21/19/17	129,63 (2,65)	131,37 (3,09)	0,160
21/19 – 23/22	95,31 (6,04)	92,63 (4,59)	0,191
23/21/19	118,60 (5,19)	111,67 (4,42)	0,012

Notas: DP: Desvio Padrão. Teste t-student foi realizado, exceto em medidas indicadas com #, que foram comparadas com o teste Mann-Whitney. Valores em negrito indicam significância estatística.

Fonte: Do autor (2020)

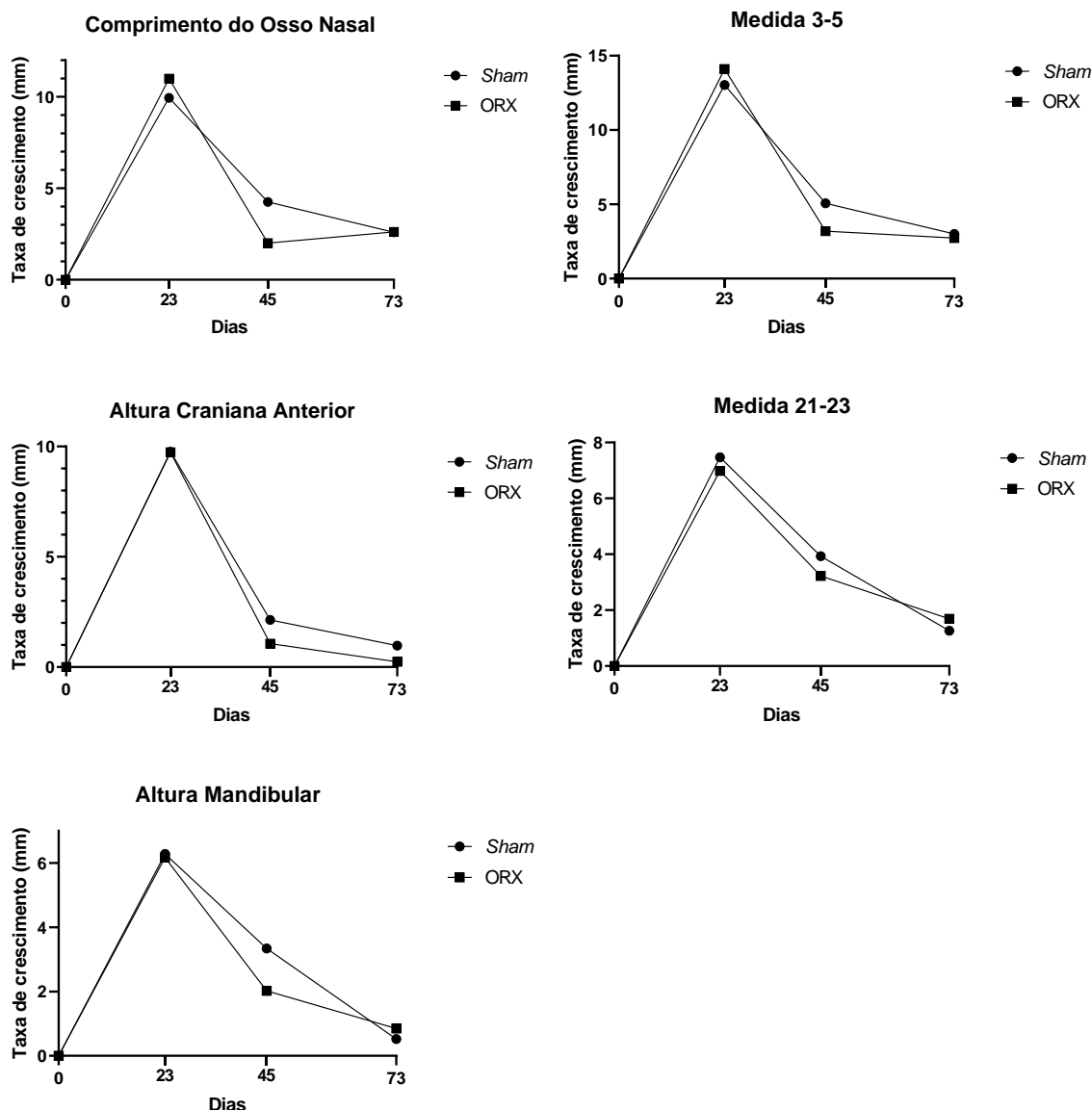


Figura 5 – Taxas de crescimento em medidas estatisticamente significantes.
Fonte: Do autor (2020).

mais espessa nos grupos ORX em ambos os tempos experimentais, enquanto a zona de cartilagem hipertrófica é mais espessa nos grupos controle. A zona articular e de calcificação foram pouco visíveis no grupo *Sham* 2.A em comparação ao grupo ORX 1.A (Figura 8)

O perióstio que recobre os lados oral e nasal da sutura palatina mediana é mais extenso e desenvolvido no grupo *Sham* 2.B em comparação ao grupo ORX 1.B, além do lado nasal no grupo controle apresentar vasos sanguíneos mais desenvolvidos

do que o grupo experimental (Figura 9). Entretanto, essas diferenças entre os grupos não são visíveis entre os grupos *Sham 2.A* e *ORX 1.A* (Figura 10)

Na sutura pré-maxilar, observa-se uma discreta diferença de comprimento nos prolongamentos das fibras periosteais entre os grupos; as fibras dos grupos *Sham* aparentemente são mais extensas em comparação aos grupos *ORX* (Figura 11)

5.2.2 – Cortes Corados em Picrosírius e Hematoxilina

A concentração de fibras colágenas tipo I nos grupos *ORX* é aparentemente menor no disco epifisário e nas trabéculas ósseas do côndilo mandibular (Figura 12). As fibras no grupo *Sham 2.A* se apresentam confinadas na zona pré-condroblástica e na zona proliferativa. No grupo *ORX 1.A*, as fibras se apresentam de modo desorganizado e com menores concentrações em comparação ao grupo *Sham 2.A*. Além disso, colágeno tipo III foi observado apenas no grupo *Sham 2.A* (Figura 13)

A sutura palatina mediana e sutura pré-maxilar não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais e controle. Foi observado apenas uma maior concentração de fibras colágenas tipo III nos grupos *Sham 2.A* e *2.B* em comparação aos grupos *ORX*. (Figuras 14 a 17)

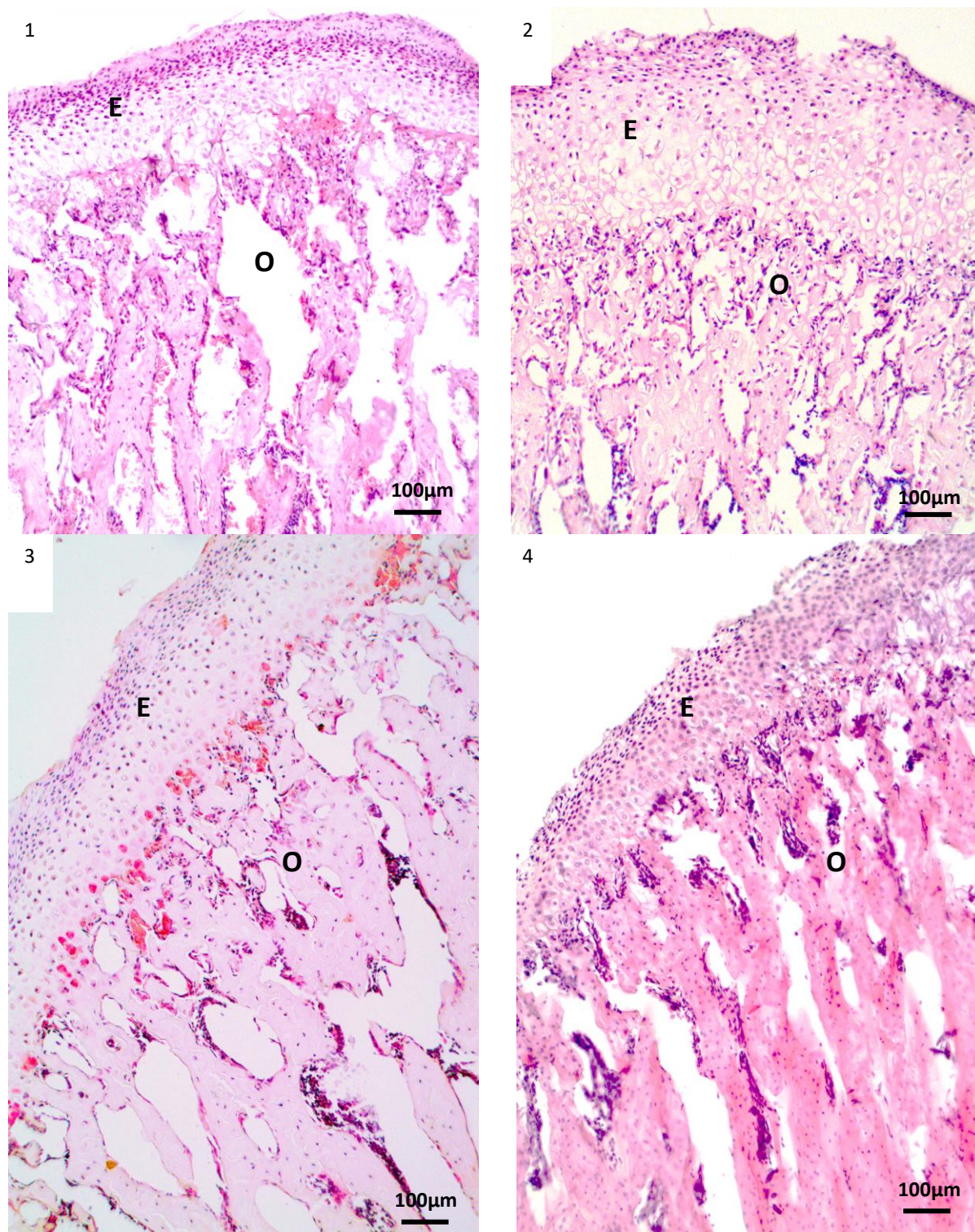


Figura 7 – Côndilo Mandibular em HE

Legenda: E: Disco Epifisário. O: Zona de Ossificação

- 1) Grupo ORX 1.B;
- 2) Grupo *Sham* 2.B
- 3) Grupo ORX 1.A
- 4) Grupo *Sham* 2.A

Fonte: Do autor (2020)

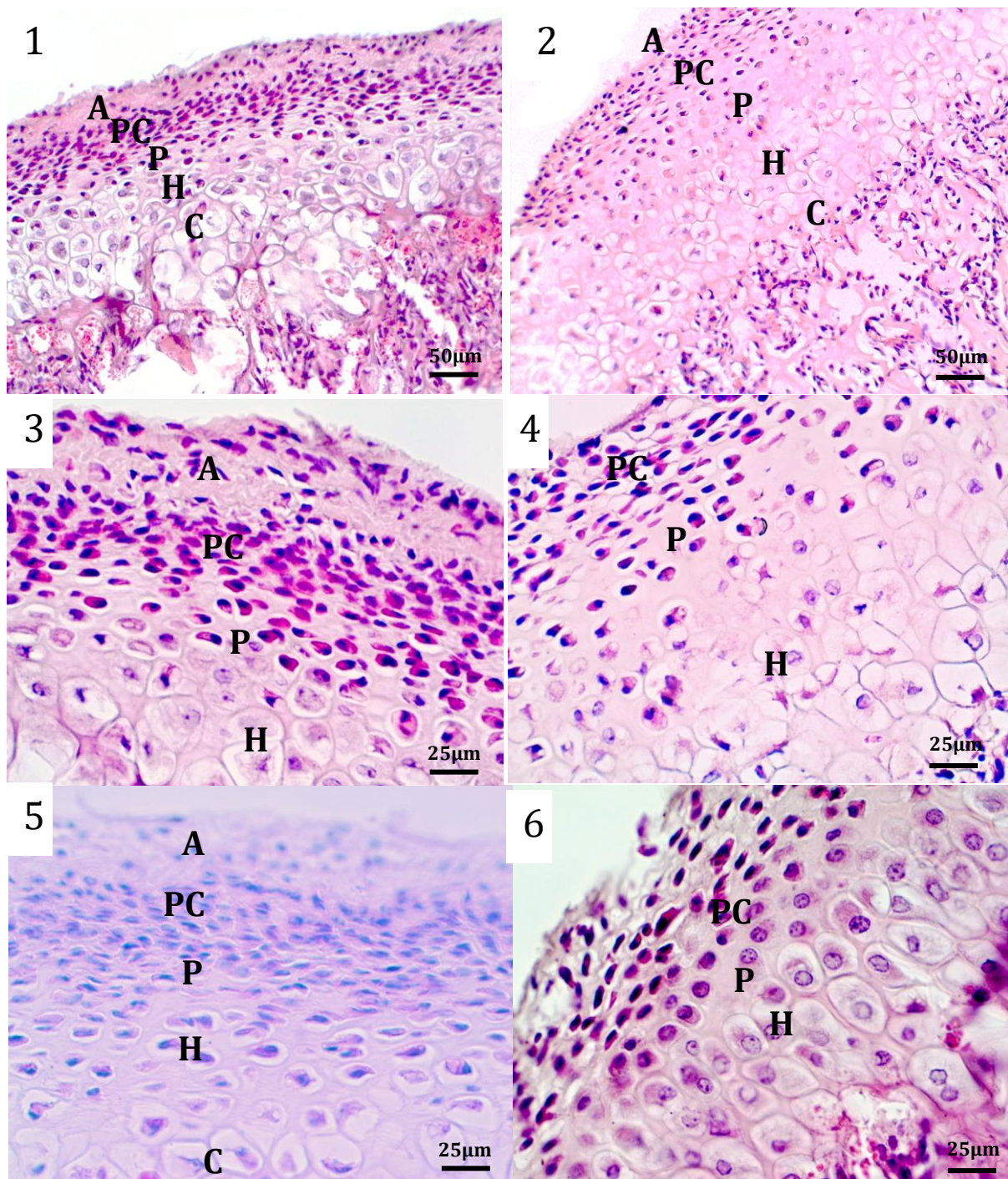


Figura 8 - Disco Epifisário do Côndilo Mandibular corado em HE

Legenda: A: Zona Articular. PC: Zona Pré-Condrolástica. P: Zona de Ploriferação. H: Zona Hiperplásica. C: Zona de Calcificação

1) e 3): Grupo ORX 1.B

2) e 4): Grupo *Sham* 2.B

5) Grupo ORX 1.A

6) Grupo *Sham* 2.A

Fonte: Do autor (2020)

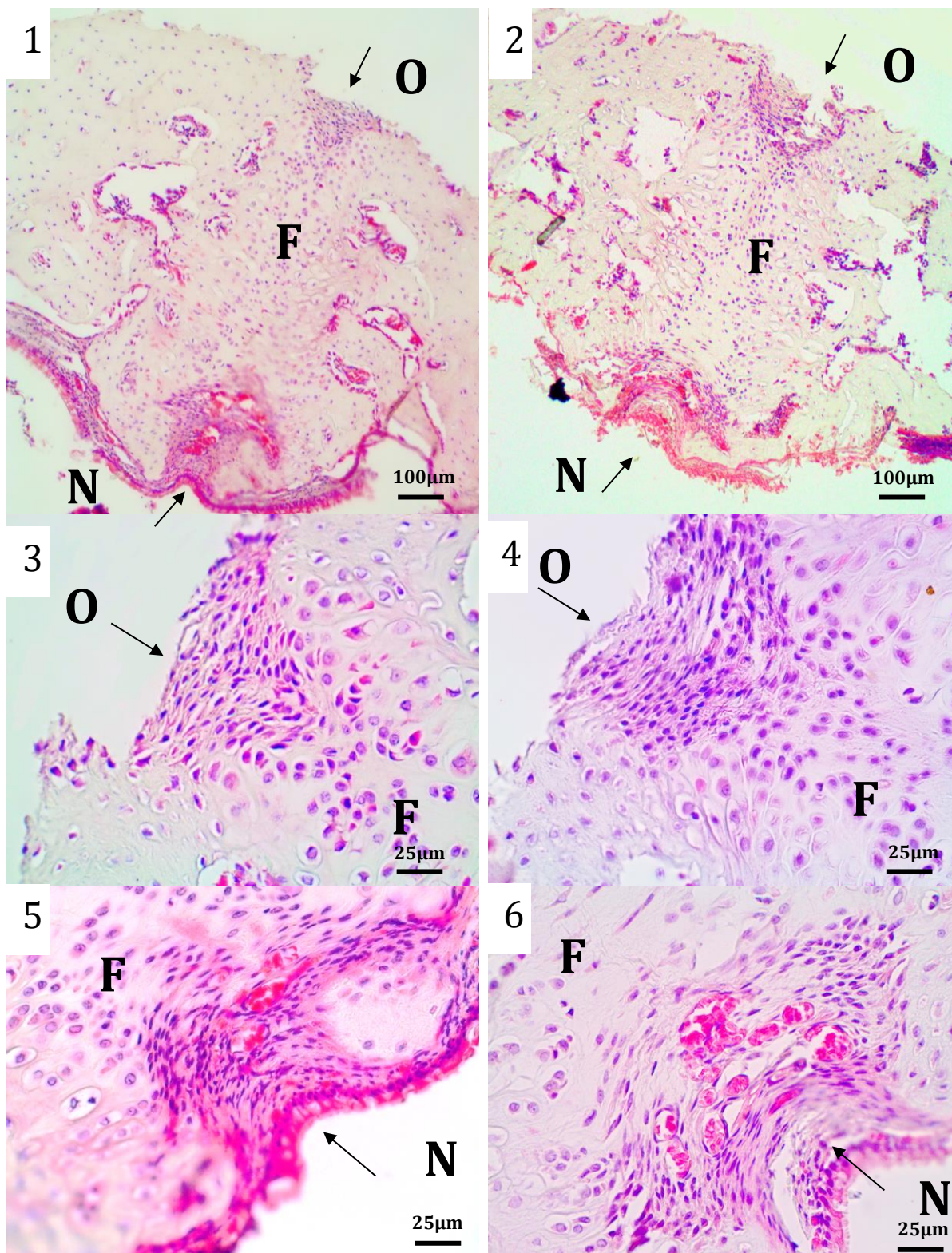


Figura 9 – Sutura Palatina Mediana aos 45 dias em HE

Legenda: O: Lado oral. N: Lado Nasal. F: Membrana Fibrosa. As setas indicam o periósteo. Números ímpares representam o Grupo ORX 1.B e números pares representam o grupo Sham 2.B.

Fonte: Do autor (2020)

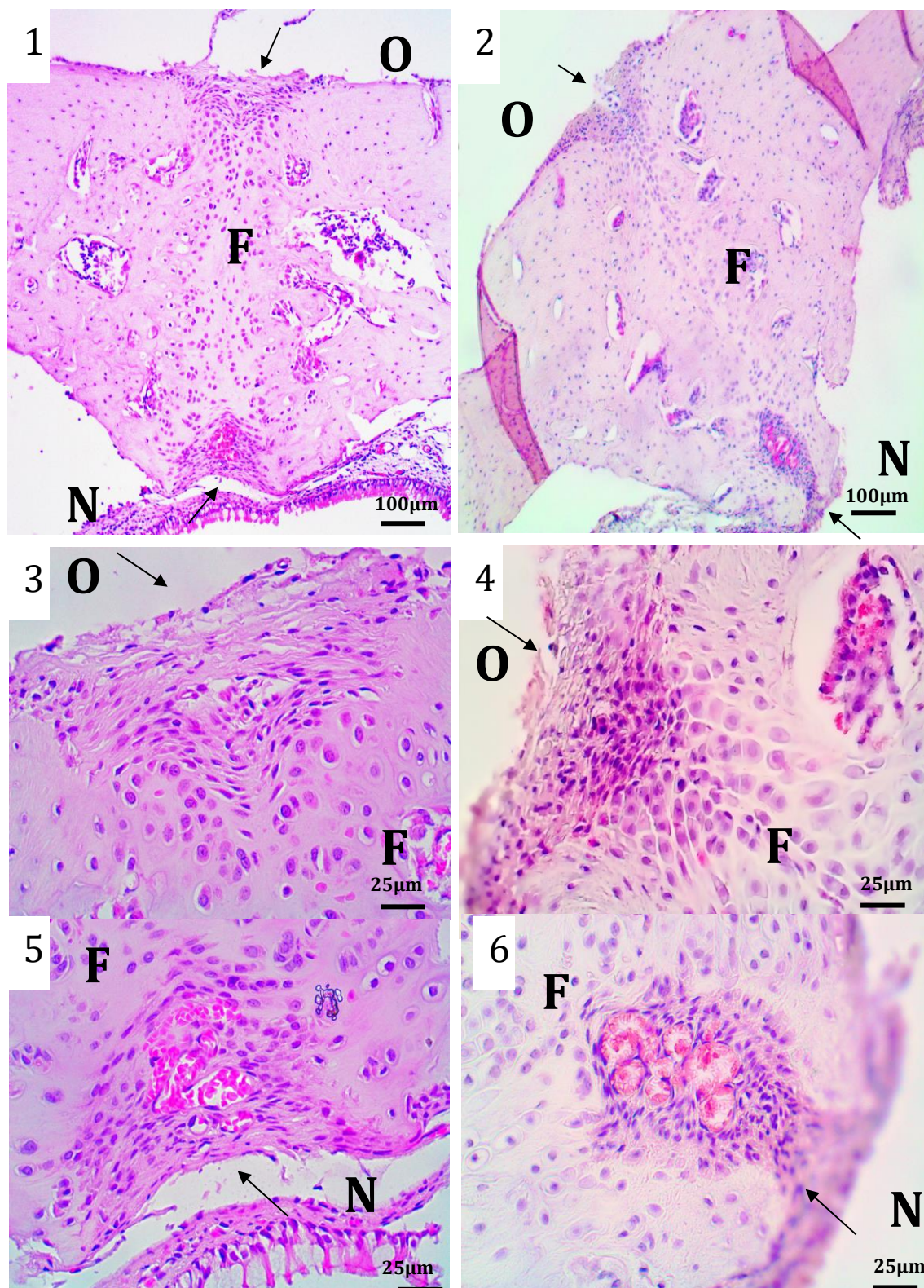


Figura 10 – Sutura Palatina Mediana aos 73 dias em HE

Legenda: O: Lado oral. N: Lado Nasal. F: Membrana Fibrosa. As setas indicam o periosteio. Números ímpares representam o Grupo ORX e números pares representam o grupo Sham.

Fonte: Do autor (2020)

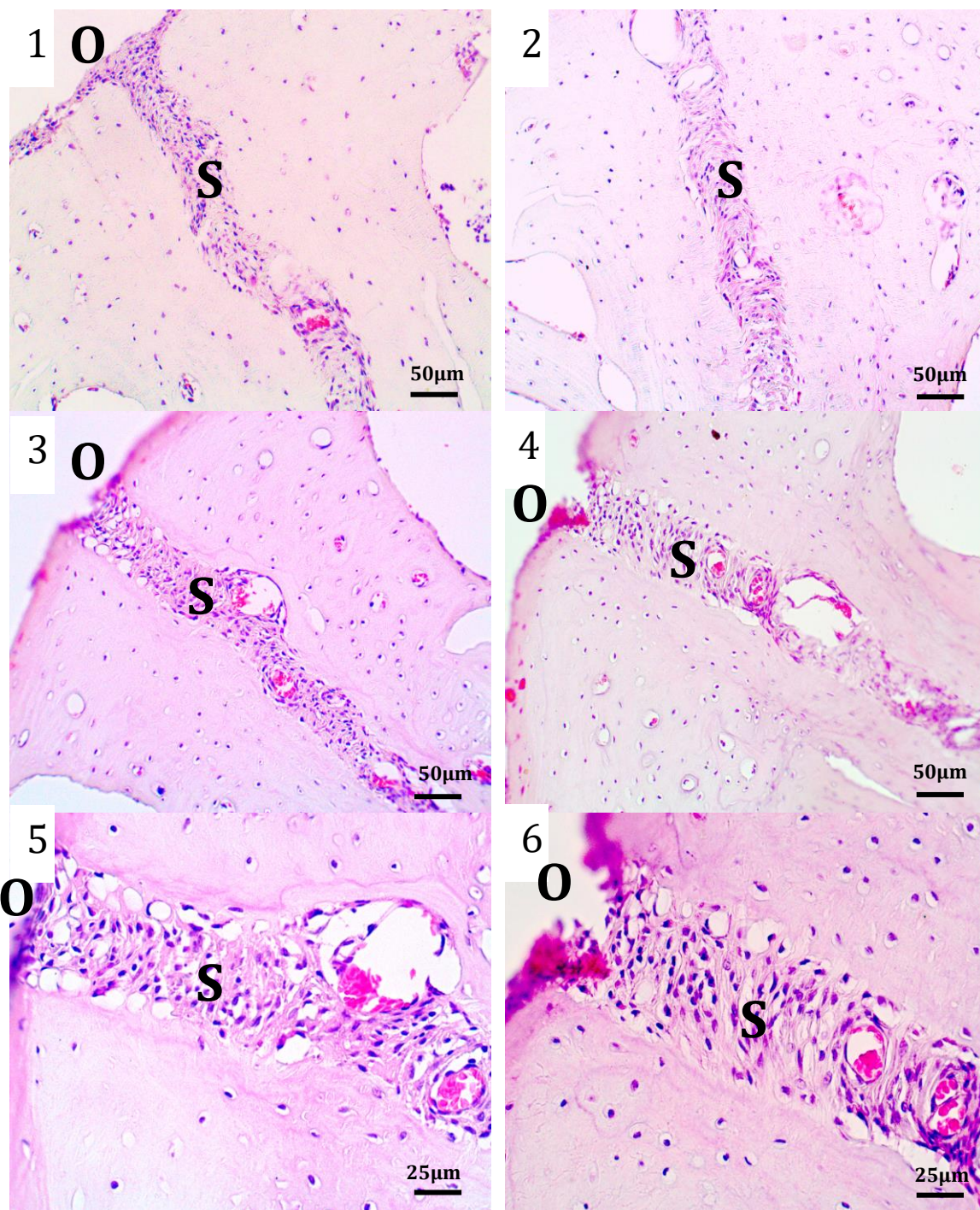


Figura 11 – Sutura Pré-Maxilar em HE

Legenda: O: Lado Oral. S: Sutura Pré-Maxilar

- 1) Grupo ORX 1.B
- 2) Grupo *Sham* 2.B
- 3) E 5) Grupo ORX 1.A
- 4) E 6) Grupo *Sham* 2.A

Fonte: Do autor (2020)

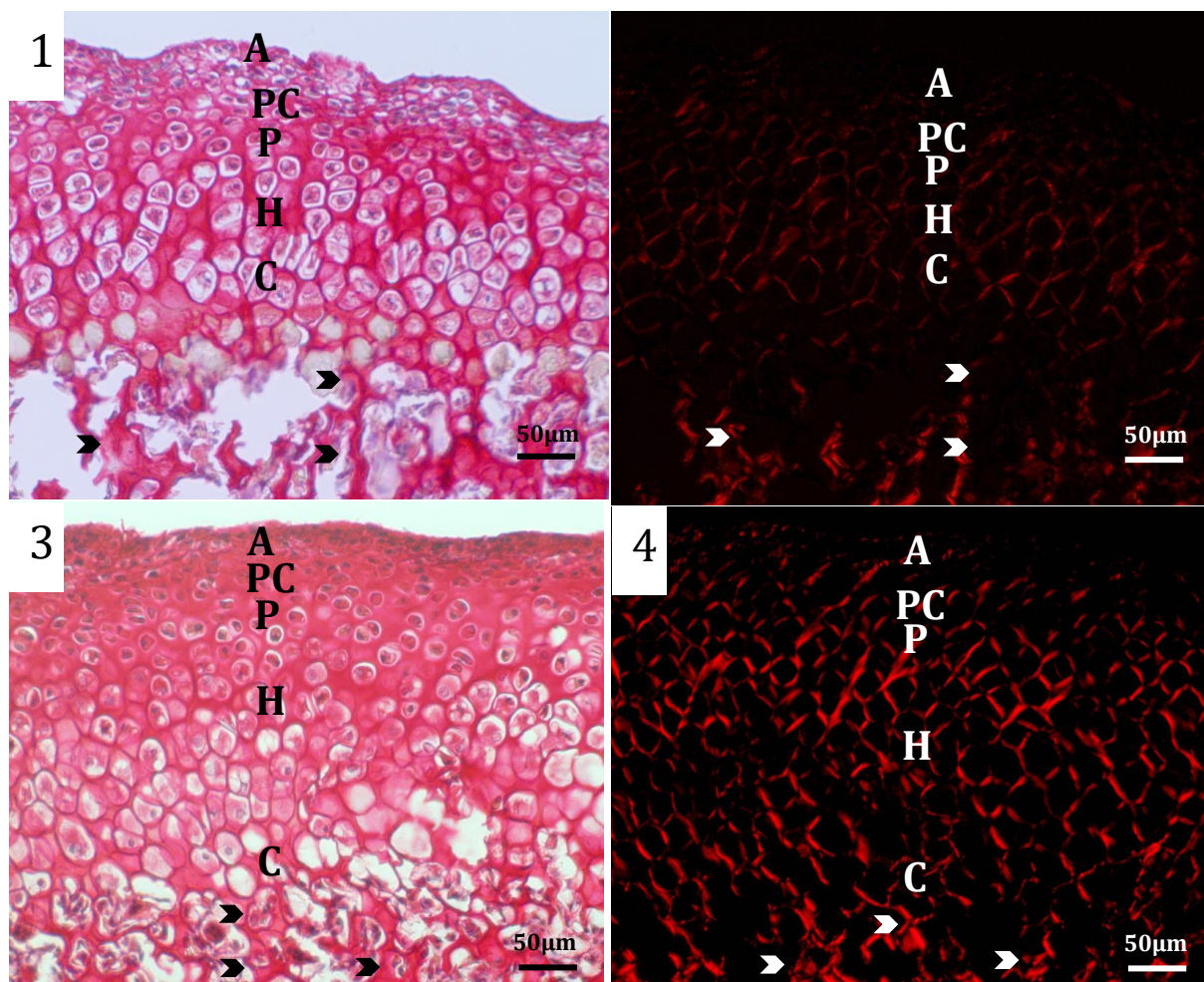


Figura 12 – Côndilo mandibular corado em Picrosírius aos 45 dias

Legenda: À esquerda, imagens em luz convencional. À direita, a mesma imagem em luz polarizada. Legenda: A: Zona Articular. PC: Zona Pré-Condrolástica. P: Zona de Proliferação. H: Zona Hiperplásica. C: Zona de Calcificação. Setas pretas e brancas indicam trabéculas ósseas.

1) e 2): Grupo ORX 1.B

3) e 4): Grupo *Sham* 2.B

Fonte: Do autor (2020)

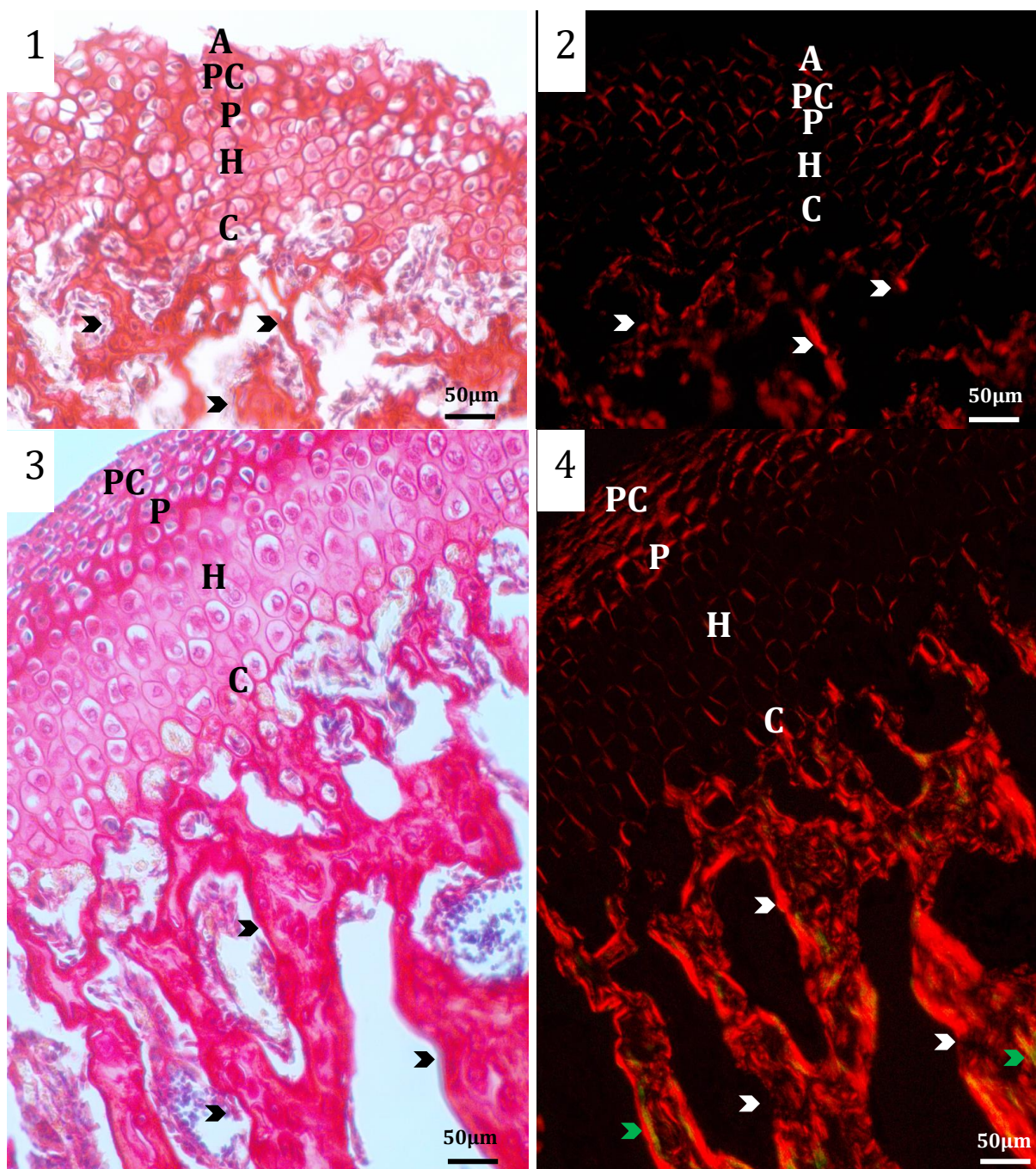


Figura 13 – Côndilo mandibular corado em Picrosírius aos 73 dias

Legenda: À esquerda, imagens em luz convencional. À direita, a mesma imagem em luz polarizada. Legenda: A: Zona Articular. PC: Zona Pré-Condrolástica. P: Zona de Ploriferação. H: Zona Hiperplásica. C: Zona de Calcificação. Setas pretas e brancas indicam trabéculas ósseas. Setas verdes indicam fibras colágenas tipo III.

1) e 2): Grupo ORX 1.A

3) e 4): Grupo Sham 2.A

Fonte: Do autor (2020)

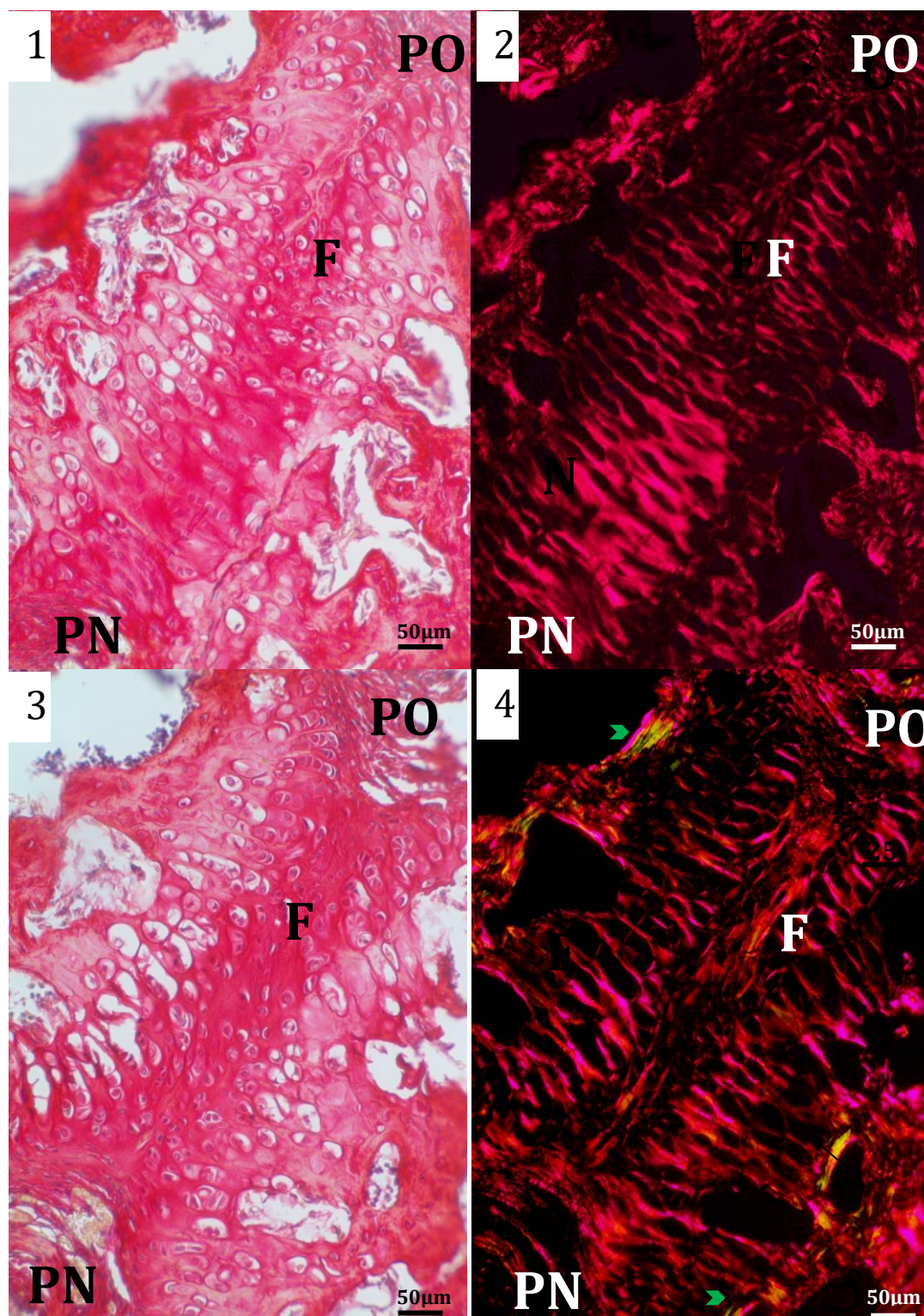


Figura 14 – Sutura Palatina Mediana corada em Picrosirius aos 45 dias

Legenda: À esquerda, imagens em luz convencional. À direita, a mesma imagem em luz polarizada. Legenda: PO: Periosteio do Lado Oral. PN: Periosteio do lado Nasal. F: Membrana Fibrosa. Setas verdes indicam fibras colágenas tipo III.

1) e 2): Grupo ORX 1.B

3) e 4): Grupo Sham 2.B

Fonte: Do autor (2020)

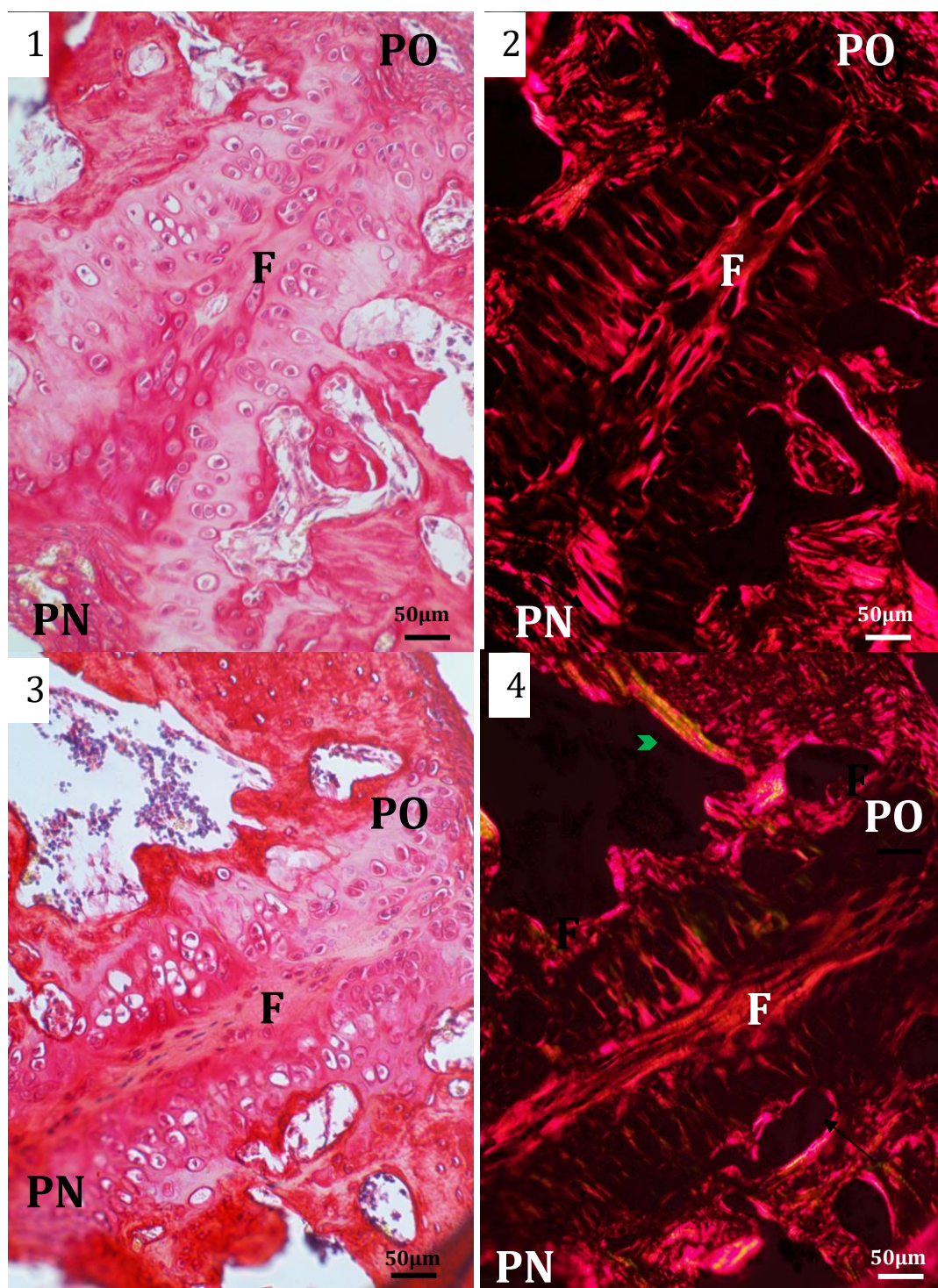


Figura 15 - Sutura Palatina Mediana corada em Picrosírius aos 73 dias

Legenda: À esquerda, imagens em luz convencional. À direita, a mesma imagem em luz polarizada. Legenda: PO: Perióstero do Lado Oral. PN: Perióstero do lado Nasal. F: Membrana Fibrosa. Setas verdes indicam fibras colágenas tipo III.

1) e 2): Grupo ORX 1.A

3) e 4): Grupo Sham 2.A

Fonte: Do autor (2020)

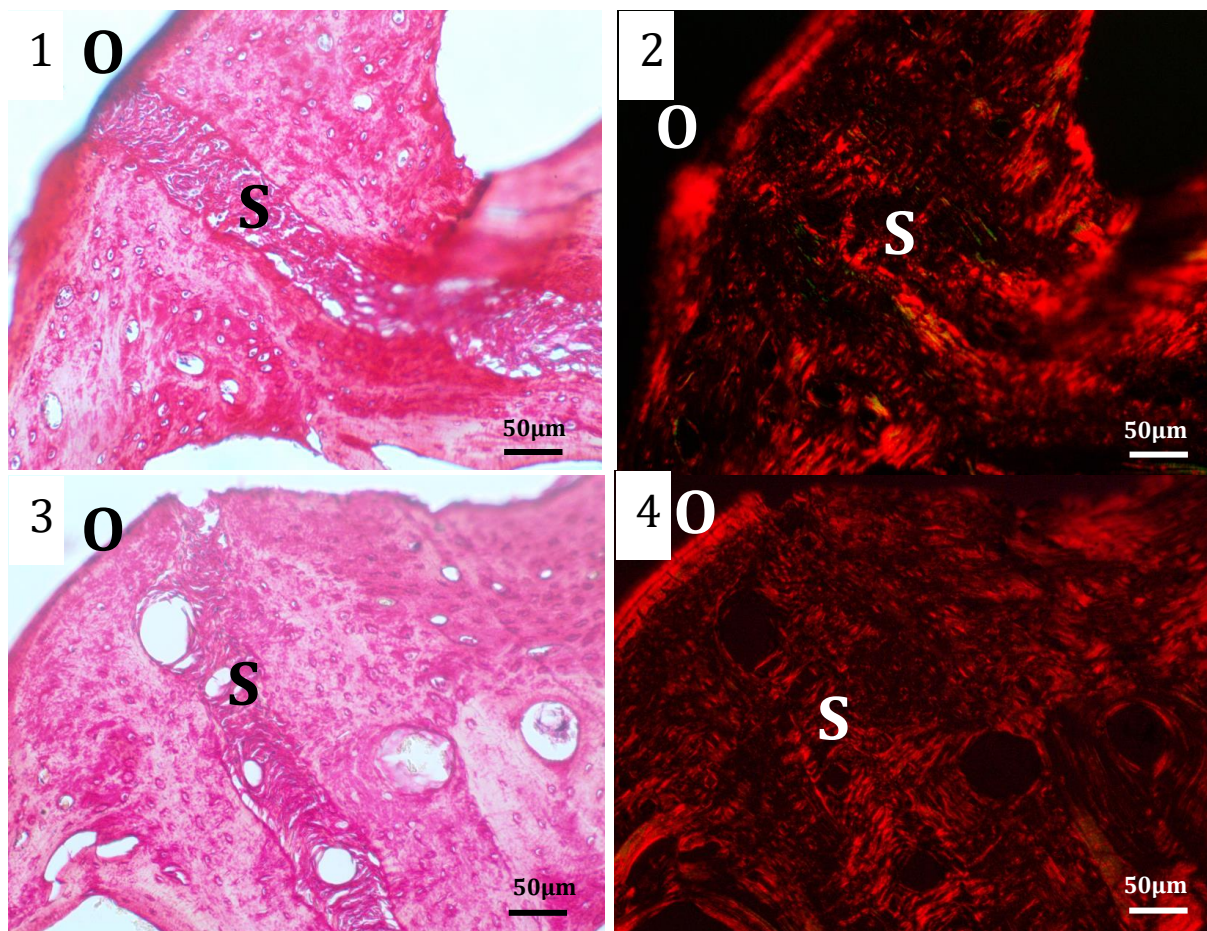


Figura 16 - Sutura Pré-Maxilar corada em Picrosírius aos 45 dias

Legenda: À esquerda, imagens em luz convencional. À direita, a mesma imagem em luz polarizada. Legenda: O: Lado Oral. S: Sutura.

1) e 2): Grupo ORX 1.B

3) e 4): Grupo Sham 2.B

Fonte: Do autor (2020)

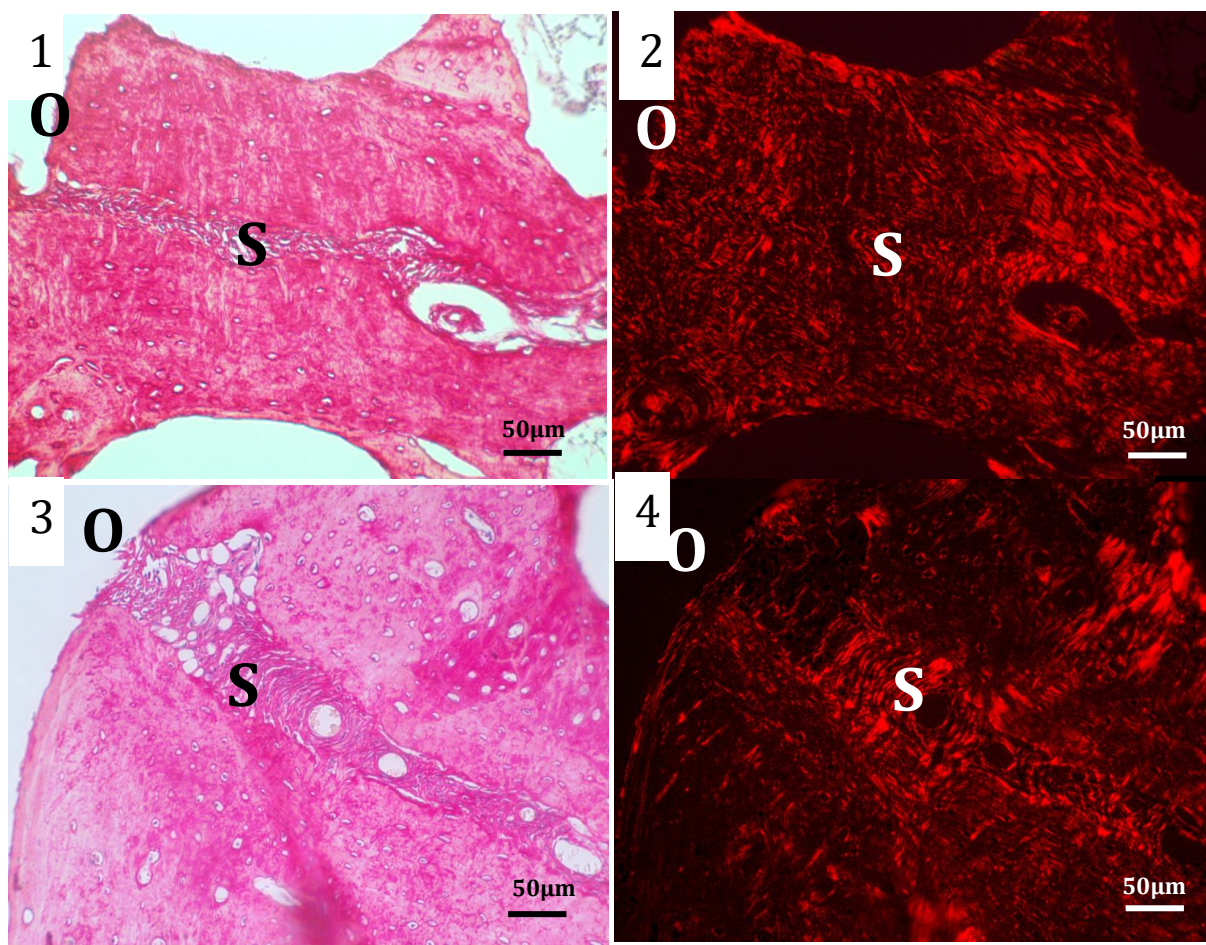


Figura 17 - Sutura Pré-Maxilar corada em Picrosírius aos 73 dias

Legenda: À esquerda, imagens em luz convencional. À direita, a mesma imagem em luz polarizada. Legenda: O: Lado Oral. S: Sutura.

1) e 2): Grupo ORX 1.A

3) e 4): Grupo Sham 2.A

Fonte: Do autor (2020)

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho permitem confirmar a hipótese inicial de que a supressão de testosterona impacta o crescimento e desenvolvimento craniofacial. A ausência deste hormônio diminuiu grande parte das medidas cranianas, maxilares e mandibulares durante a puberdade de ratos orquiectomizados no 23º dia de vida. O peso corporal dos animais experimentais também foi diminuído, em acordo com Fujita *et al.*, (2004) e Verdonck *et al.*, (1998a; 1998b). Os cortes histológicos também revelaram um decréscimo na atividade e desenvolvimento das estruturas de crescimento intramembranoso e endocondral.

A testosterona exerce influência sobre o desenvolvimento de ratos desde a gestação (WEISZ; WARD, 1980). No presente estudo, foi possível observar que durante os primeiros 20 dias de vida do animal saudável, a taxa de crescimento craniofacial é maior se comparada entre os períodos de 23 a 73 dias. No entanto, Verdonck *et al.*, (1998a) demonstra que a testosterona teria impacto sobre o crescimento craniofacial apenas entre os períodos de 40 a 50 dias, e não durante a infância do animal. O período entre 40 a 50 dias corresponde ao pico de testosterona, GH e IGF-1 em animais saudáveis (EDEN, 1979; HANDELSMAN *et al.*, 1987; LEE *et al.*, 1975). Dessa forma, a supressão de testosterona teria impacto apenas no momento de pico destes hormônios, e a orquiectomia antes da puberdade seria o momento mais indicado para avaliar seus efeitos sobre o crescimento ósseo de ratos.

Durante 45 a 73 dias, foi observada uma diminuição na tendência de queda da taxa de crescimento das medidas cefalométricas. Nesse período também ocorre a queda nos níveis sorológicos de testosterona, GHR e IGF-1 em ratos saudáveis, que indica do pico hormonal do animal e corrobora na hipótese de que a testosterona teria maior impacto no crescimento do animal durante o período de 40 a 50 dias de vida (EDEN, 1979; HANDELSMAN *et al.*, 1987; Verdonck *et al.*, 1998a).

Neste estudo, as medidas cefalométricas iniciais dos animais foram avaliadas e utilizadas como *baseline*. Algumas destas foram estatisticamente. Abed *et al.*, (2007) também encontraram diferenças em um estudo que avaliava medidas cefalométricas em ratos. As diferenças entre o nosso estudo e o desenvolvido por Abed *et al.*, (2007) podem ser atribuídas ao dia pós-natal de fornecimento dos animais (21 dias) adotado como protocolo no biotério desta instituição onde o estudo foi realizado.

As medidas cranianas, maxilares e mandibulares foram significativamente menores nos grupos orquiectomizados neste estudo, em acordo com Fujita *et al.*, (1998, 2001a, 2001b, 2004, 2006), Lerouxel *et al.*, (2004), Márquez-Hernández *et al.*, (2011) e Verdonck *et al.*, (1998a e 1998b). Em exceção, o comprimento da base craniana anterior (4-11) e a medida 5-11 foram maiores nos animais orquiectomizados ao comparar os grupos com 45 dias de vida. Estes valores foram estatisticamente maiores também na análise *baseline*, resultados que devem ser interpretados com cautela

Os resultados deste estudo corroboram com Fujita *et al.* (2001b) e Verdonck *et al.* (1998a), que observaram que as medidas cranianas e maxilares foram as mais afetadas pela supressão de testosterona, indicando uma diferença de sensibilidade à testosterona entre os crescimentos intramembranoso e cartilaginoso. A altura craniana anterior e a altura mandibular foram associadas em ambos os períodos experimentais, demonstrando que o crescimento por aposição pode sofrer maiores alterações devido a supressão de testosterona se comparado com o crescimento intersticial (VERDONCK *et al.*, 1998a). Algumas medidas estatisticamente diferentes no período de 45 dias não apresentaram diferenças no período de 73. Sugere-se que o processo normal de queda dos hormônios de crescimento possa ter igualado o crescimento entre os grupos.

Os ângulos estatisticamente diferentes nos grupos orquiectomizados demonstraram não seguirem uma tendência, ou seja, alguns ângulos foram maiores do que no grupo controle e, outros, menores. Mesmo que as medidas cefalométricas deste estudo sejam menores nos grupos ORX, os ângulos não seguem, necessariamente, a mesma tendência, assim como o ângulo formado pelos pontos ANB para a classificação de maloclusão esquelética proposta por Angle. Valores maiores que 2 indicam maloclusão classe II, que, na maioria das vezes, é associado a um retrognatismo mandibular. Isso demonstra que as estruturas cranianas são diferentemente reguladas pela testosterona (VERDONCK *et al.*, 1998a). As imagens histológicas também sugerem essa diferença de sensibilidade ao comparar o impacto da supressão de testosterona entre a Sutura Palatina Mediana e Sutura Pré-Maxilar. Ambas as estruturas possuem crescimento do tipo membranoso e em direção transversal, entretanto, não foram observadas diferenças significativas nas imagens histológicas da Sutura Pré-Maxilar entre os grupos experimental e controle, ao contrário da Sutura Palatina Mediana. Mais estudos devem ser realizados a fim de

esclarecer possíveis particularidades entre as estruturas cranianas que as tornam diferentemente sensíveis à hormônios.

A análise histológica do côndilo mandibular demonstrou que o grupo ORX possuía um disco epifisário menos espesso do que o grupo controle aos 45 dias, no entanto, essa diferença não seguiu uma tendência, e aos 73 dias, o contrário foi observado. Fujita *et al.*, (2006) também relataram que o côndilo mandibular de ratos orquiectomizados foram maiores que os do grupo controle aos 60 dias. Sugere-se que baixos níveis de testosterona possam atrasar o desenvolvimento endocondral durante a puberdade e, ao final dela, a supressão interfira na completa ocupação de matriz óssea mineralizada do disco epifisário, processo fisiológico normal ao fim do crescimento endocondral (BIGA, 2020). As análises histológicas do disco epifisário do côndilo mandibular também demonstraram que a camada de células pré-condroblásticas foram mais espessas nos grupos ORX comparadas ao grupo controle, sugerindo uma certa interferência da testosterona sobre a diferenciação destas células precursoras em condroblastos. No melhor do nosso conhecimento, apenas Kapur e Reddi (1989) observaram interferência da testosterona tanto na proliferação de células precursoras quanto na diferenciação em condroblastos. A literatura concorda que pré-condroblastos e condroblastos possuem AR em sua membrana, mas a função da testosterona sobre essas células ainda permanece desconhecida (MANOLAGAS *et al.*, 2013; MOHAMAD *et al.*, 2016; VANDERSCHUEREN *et al.*, 2014). Análises biomoleculares podem esclarecer com maior propriedade a respeito destes processos e de outros mediadores envolvidos no crescimento endocondral.

Os achados descritos para a Sutura Palatina Mediana concordam com os descritos por Mohamad *et al.*, (2016) que demonstraram que há impacto da supressão de testosterona não só na diferenciação de odontoblastos, mas, também, na proliferação de células precursoras no perióstio. Entretanto, ao fim da puberdade, a testosterona aparentemente deixa de influenciar nessa proliferação periosteal da sutura, sugerindo, novamente, que o hormônio tem maiores impactos apenas durante a puberdade.

O impacto da testosterona sobre o crescimento ósseo pode ocorrer de forma indireta ao regular a angiogênese. A angiogênese é um processo fisiológico que permite a renovação e remodelação óssea. A testosterona já tem sido utilizada como processo terapêutico em lesões ósseas em ratos e um dos principais efeitos dela é a promoção de angiogênese no local da lesão. (COSTA *et al.*, 2019; OIRSCHOT *et al.*,

2020). A angiogênese é necessária para a renovação e estímulo de crescimento intramembranoso, além de ser responsável pela chegada de odontoblastos na zona de ossificação endocondral (BIRLIK *et al.*, 2016). As imagens do côndilo e da sutura palatina mediana demonstram que a supressão de testosterona pode diminuir a angiogênese e prejudicar a renovação e mineralização das estruturas ósseas.

As imagens em picosírius deste estudo reforçam os achados de Arai *et al.*, (2016) que observaram a diminuição da síntese de colágeno tipo I após a orquiectomia de ratos. Entretanto, a testosterona aparentemente sensibiliza apenas a síntese de colágeno de estruturas de crescimento endocondral, e não intramembranoso. Estudos futuros devem ser desenvolvidos a fim de explicar a relação entre o esteroide e as fibras colágenas.

Os hormônios são um dos membros da complexa rede de interação molecular que está envolvida com o crescimento ósseo e cartilaginoso (OMORI *et al.*, 2020). O estudo da influência da supressão de testosterona torna esse estudo relevante, pois corrobora para o avanço no entendimento da etiologia das maloclusões. Além disso, este estudo também sugere que novas pesquisas em humanos sejam realizadas, de modo a mensurar os níveis sorológicos de testosterona durante a puberdade e correlacionar com o crescimento craniofacial. Este estudo também destaca a importância da análise sorológica do paciente antes de iniciar o tratamento ortodôntico a fim de levantar fatores que podem ser significantes durante o crescimento e durante a movimentação/expansão ortodôntica, como, por exemplo, os baixos níveis de testosterona, que pode influenciar diretamente na resposta do hospedeiro frente ao tratamento.

A impossibilidade de realizar análise estatística da taxa de crescimento entre as medidas é uma limitação deste estudo. No entanto, é possível inferir que as medidas são afetadas pela supressão de testosterona apenas nas comparações entre os grupos. Este estudo não realizou medidas sorológicas de testosterona, mas a orquiectomia é um procedimento aprovado na literatura, sendo eficaz para a redução dos níveis de testosterona (IDRIS, 2012).

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a supressão de testosterona diminui as medidas cefalométricas do crânio, maxila e mandíbula e altera os ângulos cefalométricos em ratos ao reduzir a proliferação e diferenciação de odontoblastos e condroblastos e limitar a angiogênese no processo de renovação e mineralização óssea.

REFERÊNCIAS

- ABED, G. S. et al. Maturation and functional related differences in rat craniofacial growth. **Arch Oral Biol**, London, v. 52, n. 11, p. 1018-25, 2007.
- ACHILLEOS, A. e TRAINOR, P. A. Mouse models of rare craniofacial disorders. **Current Topics in Developmental Biology**, New York, v. 115, p. 413-58, 2015.
- ALBERT, A. M. et al. Craniofacial Changes in Children-Birth to Late Adolescence. **ARC Journal of Forensic Science**, Ongole, v. 4, n. 1, p. 1-19, 2019.
- ARAI, K. Y. et al. Postnatal changes and sexual dimorphism in collagen expression in mouse skin. **PloS one**, San Francisco, v. 12, n. 5, p. e0177534, 2017.
- BIRD, B. M. et al. Does the facial width-to-height ratio map onto variability in men's testosterone concentrations?. **Evolution and Human Behavior**, New York, v. 37, n. 5, p. 392-398, 2016.
- BIRLIK, M. et al. Effect of sex steroids on bone formation in an orthopedically expanded suture in rats. **Journal of Orofacial Orthopedics/Fortschritte der Kieferorthopädie**, München, v. 77, n. 2, p. 94-103, 2016.
- BHASIN, S. et al. Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: an Endocrine Society clinical practice guideline. **Int J Clin Endocrinol Metab**, Hyderabad, v. 95, n. 6, p. 2536-59, 2010.
- BIGA, Lindsay M. et al. **Anatomy & physiology**. 1. ed. Paris: Open Educational Recourses, 2020.
- BROWN, R. E. Social and Hormonal Factors Influencing Infanticide and Its Suppression in Adult Male Long-Evans Rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology**, Whashington, v. 100, n. 2, p. 155-61, 1986.
- CAL-NETO, J. O. A. P. et al. Crescimento e Desenvolvimento da Maxila. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, Rio de Janeiro, v. 2, 2003.
- CENTRAL MICHIGAN UNIVERSITY. **Guidelines for Rodent Survival Surgery**. Ann Arbor, 2013.
- CLARKE, B. L.; KHOSLA, S. Androgens and bone. **Steroids**, San Francisco, v. 74, n. 3, p. 296-305, 2009.
- DA COSTA, K. J.R. et al. Testosterone improves the osteogenic potential of a composite in vitro and in vivo. **Cell and tissue research**, Berlin, v. 376, n. 2, p. 221-231, 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**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 149-55, 2011.

EDÉN, S. Age- and Sex-Related Differences in Episodic Growth Hormone Secretion in the Rat. **Endocrinology**, Oxford, v. 105, n. 2, p. 555-60, 1979.

FERGUSON, D.; DEAN, J. A. Growth of the face and dental arches. In: McDonald and Avery. **Dentistry for the Child and Adolescent**. 10th ed. Moby, Philadelphia: Eslevier, p. 375-89, 2015.

FITTS, J. M.; KLEIN, R. M.; C.A, P. Comparison of Tamoxifen and Testosterone Propionate in Male Rats: Differential Prevention of Orchidectomy Effects on Sex Organs, Bone Mass, Growth, and the Growth Hormone–IGF-I Axis. **Journal of Andrology**, East Dundee, v. 25, n. 4, p. 523-35, 2013.

FUJITA, T. et al. Differences in the influences of ovariectomy and orchietomy on the remodeling of mandibular condyle and femora in mice. **Biomedical Research**, Tokyo, v. 22, n. 6, p. 291-294, 2001a.

FUJITA, T. et al. Breadth of the mandibular condyle affected by disturbances of the sex hormones in ovariectomized and orchietomized mice. **Clin. Orthod. Res.** Copenhagen , v. 4, p. 172-6, 2001b.

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

FUJITA, T. et al. Effects of Sex Hormone Disturbances on Craniofacial Growth in Newborn Mice. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 83, n. 3, p. 250-254, 2004.

GIBBS, R. A. et al. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. **Nature**, London, v. 428, p. 493-522, 2004.

HANDELSMAN, D. J. et al. Hormonal Regulation of the Peripubertal Surge of Insulin-Like Growth Factor-I in the Rat. **Endocrinology**, Oxford, v. 120, n. 2, p. 491-97, 1987.

HODGES-SIMEON, C. R. et al. Facial width-to-height ratio (fWHR) is not associated with adolescent testosterone levels. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 4, p. e0153083, 2016.

HOOIJMANS, C. R.; LEENAARS, M.; RITSKES-HOITINGA, M. A Gold Standard Publication Checklist to Improve the Quality of Animal Studies, to Fully Integrate the Three Rs, and to Make Systematic Reviews More Feasible. **Atla**, Londo, v. 38, p. 167-82, 2010.

IDRIS, A. I. Ovariectomy/orchidectomy in rodents. **Methods Mol Biol**, Clifton v. 816, p. 545-51, 2012.

JI, S. et al. Low Bone Mineral Density Is Associated with Tooth Loss in Postmenopausal Women: A Nationwide Representative Study in Korea. **J Womens Health**, Larchmont, v. 25, n. 11, p. 1159-1165, 2016.

JING, Z. et al. Factors Affecting the Clinical Success Rate of Miniscrew Implants for Orthodontic Treatment. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard v. 31, n. 4, p. 835-41, 2016.

JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2013.

KAPUR, S. P.; REDDI, A. H. Influence of testosterone and dihydrotestosterone on bone-matrix induced endochondral bone formation. **Calcified tissue international**, New York, v. 44, n. 2, p. 108-113, 1989.

KILIARIDIS, S.; ENGSTRÖM, C.; THILANDER, B. The relationship between masticatory function and craniofacial morphology. **European Journal of Orthodontics**, Oxford, v. 7, p. 273-83, 1985.

KILKENNY, Carol et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. **PLoS Biol**, San Francisco, v. 8, n. 6, p. e1000412, 2010.

KOOLHAAS, J. M. The laboratory rat. In: HUBRECHT, R.; KIRKWOOD, J. **The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2010. cap. 22, p. 311-26.

KOUSTENI, S. et al. Reversal of Bone Loss in Mice by Nongenotropic Signaling of Sex Steroids. **Science**, Washington, v. 298, p. 843-9, 2002.

KÜCHLER, E. C. et al. Potential interactions among single nucleotide polymorphisms in bone-and cartilage-related genes in skeletal malocclusions. **Orthodontics & Craniofacial Research**, Oxford, 2020.

LABRIE, F. et al. Comparable amounts of sex steroids are made outside the gonads in men and women: strong lesson for hormone therapy of prostate and breast cancer. **J Steroid Biochem Mol Biol**, Oxford, v. 113, n. 1-2, p. 52-6, 2009.

LEE, V. W. K. et al. VARIATIONS IN SERUM FSH, LH AND TESTOSTERONE LEVELS IN MALE RATS FROM BIRTH TO SEXUAL MATURITY. **J. Reprod. Fert.** Cambridge, v. 42, 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**, New York, v. 34, n. 4, p. 273-279, 2013.

LEROUXEL, E. et al. Mandibular bone loss in an animal model of male osteoporosis (orchidectomized rat): a radiographic and densitometric study. **Osteoporos Int**, London, v. 15, n. 10, p. 814-9, 2004.

MACEDO, S. A. et al. Animal modeling in bone research—Should we follow the White Rabbit?. **Animal models and experimental medicine**, New Jersey, v. 2, n. 3, p. 162-168, 2019.

MANOLAGAS, S. C.; O'BRIEN, C. A.; ALMEIDA, M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. **Nat Rev Endocrinol**, London, v. 9, n. 12, p. 699-712, 2013.

MARQUEZ HERNANDEZ, 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**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 564-9, 2011.

MIOT, H. A. Sample size in clinical and experimental trials. **J Vasc Bras**, Salvador, v. 10, n. 4, p. 275-8, 2011.

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

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro v. 86, p. 1-11, 1991.

NODA, K. et al. Effects of the Anabolic Steroid Nandrolone Phenylpropionate on Craniofacial Growth in Rats. **JOURNAL OF MORPHOLOGY**, Hoboken, v. 220, p. 25-33, 1994.

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

OTTO, Glen M.; FRANKLIN, Craig L.; CLIFFORD, Charles B. Biology and diseases of rats. In: FOX, J. G et al. **Laboratory animal medicine**. Oxford: Academic Press, 2015. cap. 4, p. 151-207.

PENTON-VOAK, I. S.; CHEN, J. Y. High salivary testosterone is linked to masculine male facial appearance in humans. **Evolution and Human Behavior**, New York, v. 25, n. 4, p. 229-241, 2004.

PINZAN, A. et al. Crescimento e desenvolvimento craniofacial. In: JANSON G. et al. **Introdução à ortodontia (Abeno)**. São Paulo: Artes Médicas, 2006. cap.1, p. 11-15, 2006.

PORFÍRIO, E.; FANARO, G. B. Collagen supplementation as a complementary therapy for the prevention and treatment of osteoporosis and osteoarthritis: a systematic review. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 153-164, 2016.

PRITCHETT-CORNING, K. R. et al. Principles of Rodent Surgery for the New Surgeon. **Journal of Visualized Experiments**, Boston, n. 47, 2011.

SALONIA, A. et al. Paediatric and adult-onset male hypogonadism. **Nature Reviews Disease Primers**, London, v. 5, n. 1, p. 1-21, 2019.

SCHAFRUM MACEDO, A. et al. Animal modeling in bone research—Should we follow the White Rabbit? **Animal Models and Experimental Medicine**, New Jersey, v. 2, n. 3, p. 162-168, 2019.

SCHMIDT, S. et al. Low bone mineral density in children and adolescents with inflammatory bowel disease: a population-based study from Western Sweden. **Inflamm Bowel Dis**, Oxford, v. 15, n. 12, p. 1844-50, 2009.

SINGH, B. P. et al. Association of testosterone and bone mineral density with tooth loss in men with chronic periodontitis. **Journal of Oral Science**, Tokyo, v. 53, n. 3, p. 333-9, 2011.

SMITH, A. J. et al. PREPARE: guidelines for planning animal research and testing. **Lab Anim**, London, v. 52, n. 2, p. 135-141, 2018.

VAN OIRSCHOT, B. A. J. A. et al. Evaluation of Collagen Membranes Coated with Testosterone and Alendronate to Improve Guided Bone Regeneration in Mandibular Bone Defects in Minipigs. **Journal of Oral & Maxillofacial Research**, Kaunas, v. 11, n. 3, 2020.

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

VENKEN, K. et al. Impact of androgens, growth hormone, and IGF-I on bone and muscle in male mice during puberty. **J Bone Miner Res**, New York, v. 22, n. 1, p. 72-82, 2007.

VERDONCK, A. et al. Effect of testosterone replacement after neonatal castration on craniofacial growth in rats. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 43, p. 551-557, 1998a.

VERDONCK, A. et al. Comparative effects of neonatal and prepubertal castration on craniofacial growth in rats. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 43, p. 861-71, 1998b.

VERDONCK, A. et al. Effect of low-dose testosterone treatment on craniofacial growth in boys with delayed puberty. **European Journal of Orthodontics**, Oxford, v. 21, p. 137-43, 1999.

VISWANATHAN, V.; EUGSTER, E. A. Etiology and treatment of hypogonadism in adolescents. **Pediatric Clinics**, Philadelphia, v. 58, n. 5, p. 1181-1200, 2011.

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

WEISZ, J.; WARD, I. L. Plasma Testosterone and Progesterone Titers of Pregnant Rats, Their Male and Female Fetuses, and Neonatal Offspring. **Endocrinology**, Oxford, v. 106, n. 1, p. 306-17, 1980.

WHITE, T. D. et al. **Human osteology**. 3. ed. Cambridge: Academic press, 2011.

WHITEHOUSE, A. J. O. et al. Prenatal testosterone exposure is related to sexually dimorphic facial morphology in adulthood. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 282, n. 1816, p. 20151351, 2015.

WU, J. et al. The androgen receptor is required for maintenance of bone mass in adult male mice. **Mol Cell Endocrinol**, Amsterdam, v. 479, p. 159-169, 2019a.

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

ANEXO A - GUIDELINE PREPARE

Smith *et al.*

137

Table 1. The PREPARE guidelines short checklist.

Topic	Recommendation
(A) Formulation of the study	
1. Literature searches	<input type="checkbox"/> Form a clear hypothesis, with primary and secondary outcomes. <input type="checkbox"/> Consider the use of systematic reviews. <input type="checkbox"/> Decide upon databases and information specialists to be consulted, and construct search terms. <input type="checkbox"/> Assess the relevance of the species to be used, its biology and suitability to answer the experimental questions with the least suffering, and its welfare needs. <input type="checkbox"/> Assess the reproducibility and translatability of the project.
2. Legal issues	<input type="checkbox"/> Consider how the research is affected by relevant legislation for animal research and other areas, e.g. animal transport, occupational health and safety. <input type="checkbox"/> Locate relevant guidance documents [e.g. EU guidance on project evaluation].
3. Ethical issues, harm–benefit assessment and humane endpoints	<input type="checkbox"/> Construct a lay summary. <input type="checkbox"/> In dialogue with ethics committees, consider whether statements about this type of research have already been produced. <input type="checkbox"/> Address the 3Rs (replacement, reduction, refinement) and the 3Ss (good science, good sense, good sensibilities ²⁰). <input type="checkbox"/> Consider pre-registration and the publication of negative results. <input type="checkbox"/> Perform a harm–benefit assessment and justify any likely animal harm. <input type="checkbox"/> Discuss the learning objectives, if the animal use is for educational or training purposes. <input type="checkbox"/> Allocate a severity classification to the project. <input type="checkbox"/> Define objective, easily measurable and unequivocal humane endpoints. <input type="checkbox"/> Discuss the justification, if any, for death as an endpoint.
4. Experimental design and statistical analysis	<input type="checkbox"/> Consider pilot studies, statistical power and significance levels. <input type="checkbox"/> Define the experimental unit and decide upon animal numbers. <input type="checkbox"/> Choose methods of randomization, prevent observer bias, and decide upon inclusion and exclusion criteria.
(B) Dialogue between scientists and the animal facility	
5. Objectives and timescale, funding and division of labour	<input type="checkbox"/> Arrange meetings with all relevant staff when early plans for the project exist. <input type="checkbox"/> Construct an approximate timescale for the project, indicating the need for assistance with preparation, animal care, procedures and waste disposal/decontamination. <input type="checkbox"/> Discuss and disclose all expected and potential costs. <input type="checkbox"/> Construct a detailed plan for division of labour and expenses at all stages of the study.

[continued]

Table 1. Continued

Topic	Recommendation
6. Facility evaluation	<input type="checkbox"/> Conduct a physical inspection of the facilities, to evaluate building and equipment standards and needs.
7. Education and training	<input type="checkbox"/> Discuss staffing levels at times of extra risk. <input type="checkbox"/> Assess the current competence of staff members and the need for further education or training prior to the study.
8. Health risks, waste disposal and decontamination	<input type="checkbox"/> Perform a risk assessment, in collaboration with the animal facility, for all persons and animals affected directly or indirectly by the study. <input type="checkbox"/> Assess, and if necessary produce, specific guidance for all stages of the project. <input type="checkbox"/> Discuss means for containment, decontamination, and disposal of all items in the study.
(C) Quality control of the components in the study	
9. Test substances and procedures	<input type="checkbox"/> Provide as much information as possible about test substances. <input type="checkbox"/> Consider the feasibility and validity of test procedures and the skills needed to perform them.
10. Experimental animals	<input type="checkbox"/> Decide upon the characteristics of the animals that are essential for the study and for reporting. <input type="checkbox"/> Avoid generation of surplus animals.
11. Quarantine and health monitoring	<input type="checkbox"/> Discuss the animals' likely health status, any needs for transport, quarantine and isolation, health monitoring and consequences for the personnel.
12. Housing and husbandry	<input type="checkbox"/> Attend to the animals' specific instincts and needs, in collaboration with expert staff. <input type="checkbox"/> Discuss acclimatization, optimal housing conditions and procedures, environmental factors and any experimental limitations on these (e.g. food deprivation, solitary housing).
13. Experimental procedures	<input type="checkbox"/> Develop refined procedures for capture, immobilization, marking, and release or rehoming. <input type="checkbox"/> Develop refined procedures for substance administration, sampling, sedation and anaesthesia, surgery and other techniques.
14. Humane killing, release, reuse or rehoming	<input type="checkbox"/> Consult relevant legislation and guidelines well in advance of the study. <input type="checkbox"/> Define primary and emergency methods for humane killing. <input type="checkbox"/> Assess the competence of those who may have to perform these tasks.
15. Necropsy	<input type="checkbox"/> Construct a systematic plan for all stages of necropsy, including location, and identification of all animals and samples.

A more detailed discussion, with references and links, is available at <https://norecopa.no/PREPARE>, together with a downloadable pdf version of this checklist in several languages.

ANEXO B - FERRAMENTA SYRCLE'S

Table 2 SYRCLE's tool for assessing risk of bias

Item	Type of bias	Domain	Description of domain	Review authors judgment
1	Selection bias	Sequence generation	Describe the methods used, if any, to generate the allocation sequence in sufficient detail to allow an assessment whether it should produce comparable groups.	Was the allocation sequence adequately generated and applied? (*)
2	Selection bias	Baseline characteristics	Describe all the possible prognostic factors or animal characteristics, if any, that are compared in order to judge whether or not intervention and control groups were similar at the start of the experiment.	Were the groups similar at baseline or were they adjusted for confounders in the analysis?
3	Selection bias	Allocation concealment	Describe the method used to conceal the allocation sequence in sufficient detail to determine whether intervention allocations could have been foreseen before or during enrolment.	Was the allocation adequately concealed? (*)
4	Performance bias	Random housing	Describe all measures used, if any, to house the animals randomly within the animal room.	Were the animals randomly housed during the experiment?
5	Performance bias	Blinding	Describe all measures used, if any, to blind trial caregivers and researchers from knowing which intervention each animal received. Provide any information relating to whether the intended blinding was effective.	Were the caregivers and/or investigators blinded from knowledge which intervention each animal received during the experiment?
6	Detection bias	Random outcome assessment	Describe whether or not animals were selected at random for outcome assessment, and which methods to select the animals, if any, were used.	Were animals selected at random for outcome assessment?
7	Detection bias	Blinding	Describe all measures used, if any, to blind outcome assessors from knowing which intervention each animal received. Provide any information relating to whether the intended blinding was effective.	Was the outcome assessor blinded?
8	Attrition bias	Incomplete outcome data	Describe the completeness of outcome data for each main outcome, including attrition and exclusions from the analysis. State whether attrition and exclusions were reported, the numbers in each intervention group (compared with total randomized animals), reasons for attrition or exclusions, and any re-inclusions in analyses for the review.	Were incomplete outcome data adequately addressed? (*)
9	Reporting bias	Selective outcome reporting	State how selective outcome reporting was examined and what was found.	Are reports of the study free of selective outcome reporting? (*)
10	Other	Other sources of bias	State any important concerns about bias not covered by other domains in the tool.	Was the study apparently free of other problems that could result in high risk of bias? (*)

*Items in agreement with the items in the Cochrane Risk of Bias tool.

ANEXO C – CHECKLIST ARRIVE



The ARRIVE Guidelines Checklist

Animal Research: Reporting In Vivo Experiments

Carol Kilkenny¹, William J Browne², Innes C Cuthill³, Michael Emerson⁴ and Douglas G Altman⁵

¹The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, London, UK, ²School of Veterinary Science, University of Bristol, Bristol, UK, ³School of Biological Sciences, University of Bristol, Bristol, UK, ⁴National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK, ⁵Centre for Statistics in Medicine, University of Oxford, Oxford, UK.

	ITEM	RECOMMENDATION	Section/ Paragraph
Title	1	Provide as accurate and concise a description of the content of the article as possible.	1
Abstract	2	Provide an accurate summary of the background, research objectives, including details of the species or strain of animal used, key methods, principal findings and conclusions of the study.	2
INTRODUCTION			
Background	3	a. Include sufficient scientific background (including relevant references to previous work) to understand the motivation and context for the study, and explain the experimental approach and rationale. b. Explain how and why the animal species and model being used can address the scientific objectives and, where appropriate, the study's relevance to human biology.	7-11
Objectives	4	Clearly describe the primary and any secondary objectives of the study, or specific hypotheses being tested.	12
METHODS			
Ethical statement	5	Indicate the nature of the ethical review permissions, relevant licences (e.g. Animal [Scientific Procedures] Act 1986), and national or institutional guidelines for the care and use of animals, that cover the research.	13
Study design	6	For each experiment, give brief details of the study design including: a. The number of experimental and control groups. b. Any steps taken to minimise the effects of subjective bias when allocating animals to treatment (e.g. randomisation procedure) and when assessing results (e.g. if done, describe who was blinded and when). c. The experimental unit (e.g. a single animal, group or cage of animals). A time-line diagram or flow chart can be useful to illustrate how complex study designs were carried out.	15
Experimental procedures	7	For each experiment and each experimental group, including controls, provide precise details of all procedures carried out. For example: a. How (e.g. drug formulation and dose, site and route of administration, anaesthesia and analgesia used [including monitoring], surgical procedure, method of euthanasia). Provide details of any specialist equipment used, including supplier(s). b. When (e.g. time of day). c. Where (e.g. home cage, laboratory, water maze). d. Why (e.g. rationale for choice of specific anaesthetic, route of administration, drug dose used).	15-17
Experimental animals	8	a. Provide details of the animals used, including species, strain, sex, developmental stage (e.g. mean or median age plus age range) and weight (e.g. mean or median weight plus weight range). b. Provide further relevant information such as the source of animals, international strain nomenclature, genetic modification status (e.g. knock-out or transgenic), genotype, health/immune status, drug or test naïve, previous procedures, etc.	14

The ARRIVE guidelines. Originally published in *PLoS Biology*, June 2010¹

Housing and husbandry	9	Provide details of: a. Housing (type of facility e.g. specific pathogen free [SPF]; type of cage or housing; bedding material; number of cage companions; tank shape and material etc. for fish). b. Husbandry conditions (e.g. breeding programme, light/dark cycle, temperature, quality of water etc for fish, type of food, access to food and water, environmental enrichment). c. Welfare-related assessments and interventions that were carried out prior to, during, or after the experiment.	14
Sample size	10	a. Specify the total number of animals used in each experiment, and the number of animals in each experimental group. b. Explain how the number of animals was arrived at. Provide details of any sample size calculation used. c. Indicate the number of independent replications of each experiment, if relevant.	13-14
Allocating animals to experimental groups	11	a. Give full details of how animals were allocated to experimental groups, including randomisation or matching if done. b. Describe the order in which the animals in the different experimental groups were treated and assessed.	14
Experimental outcomes	12	Clearly define the primary and secondary experimental outcomes assessed (e.g. cell death, molecular markers, behavioural changes).	16-22
Statistical methods	13	a. Provide details of the statistical methods used for each analysis. b. Specify the unit of analysis for each dataset (e.g. single animal, group of animals, single neuron). c. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach.	22
RESULTS			
Baseline data	14	For each experimental group, report relevant characteristics and health status of animals (e.g. weight, microbiological status, and drug or test naïve) prior to treatment or testing. (This information can often be tabulated).	23-24
Numbers analysed	15	a. Report the number of animals in each group included in each analysis. Report absolute numbers (e.g. 10/20, not 50% ²). b. If any animals or data were not included in the analysis, explain why.	23
Outcomes and estimation	16	Report the results for each analysis carried out, with a measure of precision (e.g. standard error or confidence interval).	23-27
Adverse events	17	a. Give details of all important adverse events in each experimental group. b. Describe any modifications to the experimental protocols made to reduce adverse events.	23
DISCUSSION			
Interpretation/scientific implications	18	a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature. b. Comment on the study limitations including any potential sources of bias, any limitations of the animal model, and the imprecision associated with the results ² . c. Describe any implications of your experimental methods or findings for the replacement, refinement or reduction (the 3Rs) of the use of animals in research.	28-29
Generalisability/translation	19	Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to translate to other species or systems, including any relevance to human biology.	28-29
Funding	20	List all funding sources (including grant number) and the role of the funder(s) in the study.	



References:

1. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol* 8(6): e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412
2. Schulz KF, Altman DG, Moher D, the CONSORT Group (2010) CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ* 340:c332.

ANEXO D – 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