



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOPEDIATRIA**



ISABELA RIBEIRO MADALENA

**INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA DE ESTRÓGENO NA TAXA DE ERUPÇÃO
DENTÁRIA EM MODELO MURINO**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2020

ISABELA RIBEIRO MADALENA

**INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA DE ESTRÓGENO NA TAXA DE ERUPÇÃO
DENTÁRIA EM MODELO MURINO**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

PROGRAMA: Odontopediatria

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Odontopediatria

ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Erika Calvano Küchler

RIBEIRÃO PRETO - SP

2020

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Madalena, Isabela Ribeiro

Influência da deficiência de estrógeno na taxa de erupção dentária em modelo murino. Ribeirão Preto, 2020.

144p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo FORP/USP - Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Küchler, Erika Calvano

1. Erupção Dentária
2. Estrógeno
3. Odontogênese
4. Fisiopatologia
5. Folículo dentário.

Trabalho realizado com apoio financeiro do Programa de Auxílio à Pesquisa Jovem Pesquisador (Processo 2015/06866-5) concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Bolsa de doutorado do Programa de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e Programa de Excelência Acadêmica – CAPES/PROEX (0487).

FOLHA DE APROVAÇÃO

MADALENA, I.R. **Influência da deficiência de estrógeno na taxa de erupção dentária em modelo murino.**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

PROGRAMA: Odontopediatria

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Odontopediatria

Data da defesa: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^(a).Dr^(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof^(a).Dr^(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof^(a).Dr^(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva - Presidente da Banca Examinadora
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Julgamento: _____ Assinatura: _____

ISABELA RIBEIRO MADALENA

Nascimento 20 de março de 1991 – Nazareno/MG

Filiação Paulo Rafael Madalena e Maria Lúcia Ribeiro Madalena

2009-2013 Graduação em Odontologia

Universidade José do Rosário Vellano/UNIFENAS, Brasil.

Trabalho de conclusão de curso intitulado: "Levantamento da produção ortodôntica no Centro Pró-Sorriso UNIFENAS/Centrinho. "

Orientador: Prof. Me. Julian Miranda Orsi Júnior

2013-2016 Especialização em Odontopediatria

Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic, Brasil.

Trabalho de conclusão de curso intitulado: "Avaliação clínica e radiográfica de molares decíduos submetidos ao selamento de cárie dentária, remoção parcial e total em metade externa e interna de dentina no município de Nazareno-MG."

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Pettorossi Imparato

2013-2016 Mestrado Profissional em Odontologia

Área de Concentração: Odontopediatria

Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic, Brasil.

Dissertação intitulada: "Avaliação clínica e radiográfica de molares decíduos submetidos ao selamento de cárie dentária, remoção parcial e total em metade externa e interna de dentina no município de Nazareno-MG."

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Pettorossi Imparato

2018-2018 Aperfeiçoamento em Odontologia para Pacientes Especiais

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

2017-Atual Doutorado em Ciências

Área de Concentração: Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, Brasil.

Tese intitulada: Influência da deficiência de estrógeno na taxa de erupção dentária

Orientadora: Prof^a. Dra. Erika Calvano Küchler

Bolsista Capes/Proex (0487)

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à minha mãe, ao meu pai e minha querida irmã que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. O cuidado e a dedicação significam segurança e certeza que não estou sozinha nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por sua infinita bondade e misericórdia. Me abençoou com uma família maravilhosa, amigos encantadores, saúde e perseverança para lutar por meus ideais. Agradeço por guiar e iluminar meus caminhos. Serei infinitamente grata por me fazer especial em meio à multidão.

Aos meus pais Paulo e Maria Lúcia, minhas fontes de inspiração!

De todos os amores que podemos receber durante a vida, o amor dos nossos pais é o mais especial. Não existe outro que consiga ser tão completo e demonstrar ao mesmo tempo, um interesse tão grande e genuíno na nossa felicidade. Agradeço por vocês existirem em minha vida, por serem o que são, pelo carinho e dedicação em todos esses anos. Agradeço por me ensinarem a sentir paixão pela vida. Sou muito feliz porque aprendi a ser feliz com vocês.

A minha irmã Isabela Cristina (Tininha), pela relação ímpar que tivemos ao longo de todos esses anos. Eu costumo dizer que ela é a minha metade, é aquilo que me completa, parece que ela nasceu só para me fazer descobrir como é bom ter uma pessoa ao seu lado para compartilhar aquilo que você não é capaz de suportar sozinho. Muito obrigada pelo companheirismo e cumplicidade de sempre!

À **minha família, em especial as minhas primas Iara, Fernanda e Cecília**. É reconfortante saber que existem muitos ouvidos dispostos a escutar nossos problemas, muitas bocas prontas a desvendar conselhos e abraços que acalentam em momentos tortuosos.

À **Universidade de São Paulo**, na pessoa do atual Reitor, Prof. Dr. Vahan Agopyan e do Vice-Reitor, Prof. Dr. Antônio Carlos Hernandes.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, na pessoa da atual Diretora Prof^a. Dr^a. Léa Assed Bezerra da Silva, e do Vice-Diretor Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior.

A **Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, na pessoa da atual Coordenadora, Prof^a. Dr^a. Raquel Assed Bezerra Segato e da Vice-Coordenadora, Prof^a. Dr^a. Léa Assed Bezerra da Silva.

Aos **Professores do Departamento de Clínica Infantil da FORP-USP**, Prof^a. Dr^a Alexandra Mussolino de Queiroz, Prof^a. Dr^a. Andiana De Rossi Daldegan, Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano, Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho, Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, Prof^a. Dr^a. Kranya Victoria Díaz Serrano, Prof^a. Dr^a. Léa Assed Bezerra da Silva, Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete Stuaní Sasso, Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Borsato, Prof^a. Dr^a. Maria da Conceição Pereira Saraiva, Prof^a. Dr^a. Mírian Aiko Nakane Matsumoto e Prof^a Dr^a. Raquel Assed Bezerra Segato, pela sempre agradável convivência e por todo o conhecimento comigo compartilhado.

Uma menção especial aos professores do Departamento de Clínica Infantil da FORP-USP, **Prof^a. Dr^a. Aldevina Campos de Freitas e Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho**, exemplos de dedicação à Odontopediatria. Obrigada por todos os ensinamentos transmitidos e por me conduzir com tanta maestria em todas atividades por mim propostas.

Um agradecimento super especial ao professor **Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva**, por sempre estar presente e de portas abertas nos momentos que precisei. Agradeço pelas inúmeras oportunidades e ensinamentos durante atividades teóricas e práticas. Agradeço ainda o aceite do convite em presidir minha banca na ausência da minha orientadora. Me sinto lisonjeada com a presença de um profissional tão completo e generoso para essa função tão importante.

À **Prof^a. Dr^a. Sandra Fukada** e a especialista de laboratório **Mayara Santos Gomes**, por terem me recebido com tanto carinho no Laboratório de Biologia Óssea da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. Muito obrigada por todos os ensinamentos fundamentados para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Jorge Esquiche Léon** e especialista de laboratório **Kleber Augusto Loureiro**, por abrirem as portas do Laboratório de Histopatologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

A **Comissão de Ética no Uso de Animais** na pessoa da atual Coordenadora, Prof^a. Profa. Dra. Andiará De Rossi Daldegan e do Vice-Coordenador Prof. Dr. Michel Reis Messorá pelos esclarecimentos durante a confecção da proposta deste trabalho.

À **Dr^a. Carolina Paes Torres Mantovani**, pelo apoio, pela parceria e por todas as oportunidades a mim concedidas. Muito obrigada por estar sempre disposta a me orientar nas diversas situações clínicas que compartilhamos e pela amizade cultivada em tão pouco tempo.

Aos **Funcionários do Departamento de Clínica Infantil**, Filomena Leli Placciti, Matheus Morelli Zanela, Michele Cristina Leite Rovanholo, Marco Antônio dos Santos, Fátima Aparecida Jacinto Daniel, Fátima Aparecida Rizoli, Mary Possani Carmessano, Rosemary Alves, Karina Dadalt Quaglio e Nilza Letícia Magalhães, pela grande simpatia, dedicação e paciência. A ajuda de vocês foi de grande importância durante o tempo em que estive na FORP/USP.

Aos **Funcionários do Biotério Central**, Sr. Raphael Martini Vicente, Sr. Edson Campos R. dos Santos, Sr. Aldo Dias Feiteiro Júnior e Sr. Antônio Massaro, por serem sempre tão gentis e atenciosos durante o período em que estive no Biotério.

Aos **Funcionários da FORP-USP**, Sr. Rafael Angelo Lascale Femineli e Sr. Hermano Teixeira Machado, por toda a atenção e paciência.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa de Doutorado e a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo auxílio à pesquisa concedidos por meio da bolsa de “Jovem Pesquisador” da minha orientadora Prof^a. Dr^a. Erika Calvano Küchler.

Ao **Instituto Nacional de Graduação e Pós-Graduação Padre Gervásio – INAPÓS**, na pessoa da atual Coordenadora Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Cunha, pela oportunidade de convivência, experiência acadêmica e sensibilidade em entender minha dupla jornada.

Aos **Professores convidados para minha banca de defesa de tese** pela disponibilidade, atenção e carinho em receber meu trabalho. Desde já agradeço a colaboração com minha formação crítica.

Aos meus amigos queridos, **Renata Delgado, Marjorie Omori, Thaise Taira, Karine Figueiredo, Jéssica Santos, Guido Artemio, José Guilherme Neves e Emerson Tavares**. Vocês encheram os meus dias de alegria, otimismo e motivação.

"Choraram meu choro, sorriram meu sorriso, valeu muito por vocês existirem..."

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A minha orientadora Erika Calvano Küchler, por ter me deixado fazer parte do seu grupo de trabalho e ter acreditado em mim e nas minhas capacidades. Acredito que você não tenha conhecimento de toda minha gratidão, bem como, não tenha conhecimento do que a pós-graduação FORP/USP me proporcionou. Às vezes, é assim mesmo, as pessoas não sabem o bem que fazem. Mas foi assim, por sua sensibilidade em ouvir o próximo, fez florescer uma oportunidade quando o desanimo estava instalado. Você me fez enxergar oportunidades de mudança, recomeço e reinvenção que jamais teria coragem sem incentivo prévio. Muito obrigada pela disponibilidade, paciência e resiliência no trato simples, correto, científico e gentil, com que sempre abordou meus resultados. Obrigada por nunca ter permitido que o desalento se instalasse, mesmo quando as coisas não corriam bem. Obrigada pelo tema do trabalho, que sempre me aliciou, o que fez na maioria das vezes, conseguir ultrapassar dificuldades. Sou muito grata a Deus por ter colocado você em minha vida, ganhei uma orientadora, uma amiga e uma conselheira para vida toda...

"Professores brilhantes ensinam para uma profissão. professores fascinantes ensinam para uma vida!!!"

"As quatro leis da espiritualidade"

A primeira lei diz: "A pessoa que vem é a pessoa certa".

Ninguém entra em nossas vidas por acaso. Todas as pessoas ao nosso redor, interagindo conosco, têm algo para nos fazer aprender e evoluir em cada situação.

A segunda lei diz: "Aconteceu a única coisa que poderia ter acontecido".

Nada, absolutamente nada do que acontece em nossas vidas poderia ter sido de outra forma. Mesmo o menor detalhe. Não há nenhum "se eu tivesse feito tal coisa..." Ou "aconteceu que um outro ...". Não. O que aconteceu foi tudo o que deveria ter acontecido, e foi para aprendermos a lição e seguirmos em frente. Todas e cada uma das situações que acontecem nas nossas vidas são perfeitas.

A terceira lei diz: "Toda vez que algo se inicia é o momento certo".

Tudo começa na hora certa, nem antes nem depois. Quando estamos preparados para iniciar algo novo nas nossas vidas, é que as coisas acontecem.

E a quarta e última lei afirma: "Quando algo termina, termina".

Simplesmente assim.

Se algo acabou nas nossas vidas é para a nossa evolução. Por isso, é melhor seguir em frente e enriquecer-se com a experiência. Não é por acaso que você está lendo este texto agora. Se ele veio à sua vida hoje, é porque estava preparada para entender que nenhum floco de neve cai no lugar errado.

(Autor desconhecido)

MADALENA, IR. Influência da deficiência de estrógeno na taxa de erupção dentária em modelo murino [Tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2020.

RESUMO

A erupção dentária é um processo fisiológico definido como a migração do dente em desenvolvimento intraósseo até a sua emergência e posicionamento funcional na cavidade bucal. No entanto, alterações sistêmicas e/ou síndromes, decorrentes do desequilíbrio hormonal, são descritas como principais causadores de distúrbios nesse processo. O estrógeno apesar de ser um hormônio presente e ativo do período embrionário à puberdade, quando relacionado a taxa de erupção dentária, seu papel ainda não é elucidado. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da deficiência de estrógeno e seus receptores na taxa de erupção dentária. Quarenta ratas da linhagem Wistar Hannover foram divididas em dois grupos segundo a intervenção recebida: Grupo OVX - cirurgia de ovariectomia e Grupo SHAM - cirurgia fictícia. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no 25º dia de vida pós-uterina. A taxa de erupção dentária (mm/dia) dos incisivos inferiores foi avaliada nas condições de hipo- e hiperfunção. Imagens dos incisivos foram capturadas de forma padronizada por câmera acoplada ao estereomicroscópio óptico a partir do 35º dia de vida pós-uterina, a cada 48 e 72 horas durante 21 dias. A mensuração da taxa de erupção dentária foi realizada pelo cálculo de média, por meio da diferença entre medidas iniciais e após o período de 48/72 horas. Após a eutanásia, a região odontogênica foi utilizada para identificação histológica, análise da presença de receptores de estrógeno (ER α e ER β) e expressão gênica dos genes codificadores de ER α e ER β (*ERS1* e *ERS2*). As análises foram realizadas por meio da reação de imunohistoquímica e técnica de PCR em tempo real quantitativo. A avaliação referente a taxa de erupção dentária, peso corporal, peso do útero e expressão gênica de *ERS1* e *ERS2* foram analisadas estatisticamente utilizando os softwares SPSS 24.0 e GraphPad Prism 7.04. O teste *t de Student* foi utilizado para comparação das médias entre os grupos OVX e SHAM. O nível de significância adotado foi de 5%. A condição de hipofunção, não apresentou diferença estatística significativa quando se compara os dois grupos, OVX e SHAM ($p=0.09$). Por outro lado, quando se compara os grupos em condição de hiperfunção, o grupo OVX demonstrou taxa de erupção dentária diminuída em relação ao grupo SHAM ($p=0.03$). O grupo OVX apresentou um aumento de peso corporal significativamente maior quando comparado ao grupo SHAM ($p=0.002$). Em relação ao peso do útero, o grupo OVX apresentou uma diminuição de peso em relação ao grupo SHAM ($p\leq 0.0001$). Nos cortes histológicos foi possível identificar a presença de ER α e ER β . O ER α foi expresso em ameloblastos em ambos os grupos. Já o ER β demonstrou-se presente em células da papila dentária do grupo OVX e, em células do tecido de sustentação de ambos os grupos, OVX e SHAM. Quanto a expressão gênica, o *ERS1* não demonstrou diferença estatística significativa quando os grupos foram comparados ($p=0.33$). Entretanto, a expressão gênica de *ERS2* foi significativamente maior no grupo OVX ($p=0.05$). Pode-se concluir que a deficiência de estrógeno influencia negativamente a taxa de erupção dentária.

Palavras-chave: Erupção Dentária, Estrógeno, Odontogênese, Fisiopatologia, Folículo dentário.

MADALENA, IR. Influence of estrogen deficiency on tooth eruption rate in murine model [Thesis]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Ribeirão Preto School of Dentistry; 2020.

ABSTRACT

Dental eruption is a physiological process defined as dental migration in intraosseous development until its emergence and functional positioning in the oral cavity. However, systemic changes and/or syndromes, resulting from hormonal imbalance, are described as the main causes of disturbances in this process. Although estrogen is a hormone present and active during the embryonic period at puberty, when related to the rate of tooth eruption, its influence remains unclear. The aim of this study was to evaluate the effect of estrogen deficiency and its receptors on tooth eruption rates in murine model. Forty Wistar Hannover rats were divided into two groups after the intervention: OVX Group - ovariectomy surgery and SHAM Group – fictitious surgery. Surgical procedures were performed on the 25th postoperative day of life. A tooth eruption rate (mm/day) of the lower incisors was evaluated on hypo- and hyperfunction conditions. Incisor images was captured by optical stereomicroscope from the 35th postoperative day of life, every 48 and 72 hours for 21 days. Measurement of tooth eruption rate was performed by averaging the difference between initial measurements and after 48/72 hours. After euthanasia, the odontogenic region was used for histological identification, analysis of the presence of estrogen receptors (ER α and ER β) and gene expression of ER α and ER β coding genes (*ERS1* and *ERS2*). Analyzes were performed by immunohistochemistry reaction and quantitative real time PCR technique. The evaluation regarding tooth eruption rate, body weight, uterine weight and ER α and ER β gene expression was statistically analyzed using SPSS 24.0 and GraphPad Prism 7.04 software. *Student's t-test* was used to compare the means between OVX and SHAM groups. The adopted significance level was 5%. Hypofunction condition did not present statistically significant difference when comparing the two groups, OVX and SHAM (p 0.09). When comparing the groups in hyperfunction condition, the OVX group showed decreased tooth eruption rate compared to the SHAM group (p=0.03). The OVX group showed a significantly higher body weight increase when compared to the SHAM group (p=0.002). Regarding the weight of the uterus, the OVX group showed a decrease in weight compared to the SHAM group (p \leq 0.0001). In the histological sections it was possible to identify the presence of ER α and ER β . ER α was expressed in ameloblasts in both groups. ER β was found to be present in OVX group dental papilla cells and, in support tissue cells of both OVX and SHAM groups. *ESR1* gene expression, OVX and SHAM groups did not show statistically significant difference when compared (p=0.33). However, *ESR2* gene expression was significantly higher in the OVX group (p=0.05). It can be concluded that estrogen deficiency negatively influences the rate of tooth eruption.

Key-words: Tooth Eruption, Estrogens, Odontogenesis, Physiopathology, Dental Sac.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fluxograma - Delineamento experimental.....	52
Figura 2.	Sequência de procedimentos cirúrgicos: Ovariectomia e Cirurgia Fictícia	55
Figura 3.	Padronização das tomadas fotográficas para mensuração da taxa de erupção dentária em modelo experimental (OVX e SHAM)	59
Figura 4.	Parâmetros anatômicos referenciais delimitados nos incisivos inferiores dos modelos experimentais (OVX e SHAM)	61
Figura 5.	Delimitação de pontos referenciais iniciais após ajuste de bordo incisal direito	63
Figura 6.	Mensuração dos pontos referenciais após 48/72 horas e restabelecimento da condição inicial	62
Figura 7.	Método sequencial para avaliação quantitativa da taxa de erupção dentária em modelo murino	63
Figura 8.	Desenho esquemático de hemimandíbula íntegra e dos espécimes isolados	66
Figura 9.	Desenho esquemático da região odontogênica do incisivo inferior de roedores	67
Figura 10.	Fotomicrografia da porção média da região odontogênica do incisivo inferior de roedores após tratamento com coloração de hematoxilina e eosina – corte transversal	79
Figura 11.	Fotomicrografia da região odontogênica do incisivo inferior de roedores após tratamento com coloração de hematoxilina e eosina – corte longitudinal	81
Figura 12.	Fotomicrografia da porção final da região odontogênica do incisivo inferior de roedores após tratamento com coloração de hematoxilina e eosina – corte transversal	83
Figura 13.	Fotomicrografia da porção referente a alça cervical da região odontogênica (a e b); região de ameloblastos (c e d) e região dos tecidos de sustentação (e e f) após a realização da técnica de imunohistoquímica para ER α	87

Figura 14. Fotomicrografia da porção referente a alça cervical da região odontogênica (a e b); região de ameloblastos (c e d) e região dos tecidos de sustentação (e e f) após a realização da técnica de imunohistoquímica para ER β 89

LISTAS DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Influência do modelo experimental (OVX e SHAM) no peso corporal em função do tempo	75
Gráfico 2.	Influência do modelo experimental (OVX e SHAM) na taxa de erupção dentária em função do tempo	76
Gráfico 3.	Influência do modelo experimental (OVX e SHAM) na taxa de erupção dentária	77
Gráfico 4.	Influência do modelo experimental (OVX e SHAM) no peso do útero (em gramas)	78
Gráfico 5.	Influência do modelo experimental (OVX e SHAM) na expressão relativa de RNAm (<i>ESR1</i> e <i>ESR2</i>) na região odontogênica	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição dos grupos experimental e controle em função da intervenção sofrida.....	53
Tabela 2.	Valores resultantes da avaliação da taxa de erupção dentária ...	61
Tabela 3.	Relação dos anticorpos primários e secundários utilizados para técnica de imunohistoquímica dos diferentes grupos	69
Tabela 4.	Estatística descritiva e inferencial do peso corporal nos grupos OVX e SHAM	75
Tabela 5.	Interação entre o fator grupo experimental (OVX e SHAM) e a variável tempo: Análise de variância para um fator e medidas repetidas	77

LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ACTB:** Beta actina
- AKT:** Proteína quinase B
- ALP:** Fosfatase alcalina
- AM:** Ameloblastos
- AP1:** Proteína ativadora 1
- B:** Bordo incisal
- BMD:** Densidade mineral óssea
- CA:** Cimento acelular
- CAAE:** Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
- cAMP:** Monofosfato cíclico de adenosina
- cDNA:** Ácido desoxirribonucléico complementar
- CEUA:** Comissão de Ética no Uso de Animais
- CONCEA:** Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal
- CSF-1:** Fator-estimulante de colônia 1
- CT:** Ciclo de amplificação (cycle threshold)
- CX43:** Conexina 43
- DAB:** Diaminobenzidina
- DNA:** Ácido desoxirribonucléico
- DP:** Desvio padrão
- D:** Dentina
- D₁:** Distância do ponto mais apical da margem gengival até a marca de referência do respectivo dente
- D₂:** Distância do ponto mais apical da margem gengival até o bordo incisal ajustado
- D₃:** Distância do ponto mais apical da margem gengival até a marca de referência do respectivo dente
- D₄:** Distância do ponto mais apical da margem gengival até o bordo incisal
- E:** Esmalte

EDTA: Ácido etileno-diamino-tetra-acético

EE: Epitélio interno

EGF: Fator de crescimento epidérmico

EI: Epitélio externo

Ei: Estrato intermediário

ERk: Quinases reguladas por sinais extracelulares

ER(s): Receptor(es) de estrógeno

ER α : Receptor de estrógeno alpha

ER β : Receptor de estrógeno beta

ESR1: Gene codificador do receptor de estrógeno alpha

ESR2: Gene codificador do receptor de estrógeno beta

FD: Folículo dentário

FORP: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

FCFRP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

FSH: Hormônio folículo estimulante

FSHR: Receptor do hormônio folículo estimulante

GH: Hormônio de crescimento

GHR: Receptor do hormônio de crescimento

g: Grama (s)

GAPDH: Gliceraldeído-3-forfato desidrogenase

GFR: Taxa de filtração glomerular

GPR30: Receptor 1 de estrogênio acoplado à proteína G

GTP: Trifosfato de guanossina

IGF – 1: Fator de crescimento semelhante a insulina tipo I

Kg: Quilograma (s)

LP: Ligamento periodontal

Mapk: Proteína quinase ativada por mitogênio

MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos 1

MicroCT: Microtomografia computadorizada

mg: Miligrama (s)

mL: Mililitro (s)

mm: Milímetro (s)

- N:** Número de amostras
- n^o:** Número
- nm:** Nanômetro
- ng/mL:** Nanograma/mililitro
- OB:** Odontoblastos
- OCN:** Osteocalcina
- OPG:** Osteoprotegerina
- OSX:** Osterix
- OVX:** Ovariectomia
- p*** *P-valor*
- P:** Ponto referencial para mensuração da taxa de erupção
(ponto mais apical da margem gengival)
- PA:** Pré-ameloblastos
- PBS:** Solução salina tamponada fosfatada
- PCR:** Reação de polimerase em cadeia
- PD:** Papila dentária
- pH:** Potencial hidrogeniônico
- qPCR** Reação de polímera em cadeia quantitativo
- R:** Sulco de referência para mensuração da taxa de erupção
(sulco mesio/distal realizado na face vestibular dos incisivos inferiores)
- RANK:** Receptor ativador de NF- κ β
- RANKL:** Ligante do receptor ativador de NF- κ β
- RNA:** Ácido ribonucléico
- RNA_m:** Ácido ribonucléico mensageiro
- RNAses:** Ribonucleases
- RT-PCR:** Reação em cadeia da polimerase em tempo real
- RUNX2:** Fator de transcrição relacionado ao Runt 2
- SHAM:** Cirurgia fictícia
- SP1:*** Fator de transcrição da proteína 1
- USP:** Universidade de São Paulo
- UI:** Unidade internacional

X: Vezes

%: Por cento

μL : Microlitro (s)

μm : Micrometro (s)

Δ : Delta

$\Delta\Delta\text{CT}$: Diferença entre o ΔC_T da amostra de interesse e o ΔCT da amostra calibradora (controle)

ΔCT : Diferença entre o C_T da amostra amplificada para o gene-alvo e o C_T da mesma amostra amplificada para o gene de referência

$2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$: Exponencial para obtenção da diferença de expressão gênica entre as amostras

α : Alpha valor

β : Beta valor

$^\circ\text{C}$: graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	37
2 PROPOSIÇÃO	45
2.1 Objetivo Geral	47
2.2 Objetivos Específicos	47
3 MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1 Aspectos Éticos	51
3.2 Delineamento Experimental	51
3.3 Amostra e amostragem dos animais	52
3.4 Avaliação quantitativa do peso corporal	53
3.5 Procedimentos cirúrgicos.....	53
3.5.1 Ovariectomia e cirurgia fictícia	54
3.6 Avaliação quantitativa da taxa de erupção dentária	57
3.7 Eutanásia	65
3.8 Avaliação microscópica	66
3.8.1 Avaliação histológica	68
3.8.2 Avaliação imunohistoquímica	68
3.9 Avaliação da expressão gênica – PCR em tempo real quantitativo ..	69
3.10 Análise Estatística	71
4 RESULTADOS	73
4.1 Influência da deficiência de estrógeno no peso corporal	75
4.2 Influência da deficiência de estrógeno na taxa de erupção dentária .	75
4.3 Influência da deficiência de estrógeno na atrofia uterina	77
4.4 Avaliação microscópica da região odontogênica	78
4.4.1 Histologia da região odontogênica	78
4.4.2 Influência da deficiência de estrógeno na imunoexpressão de receptores de estrógeno (ER α e ER β) na região odontogênica	85
4.5 Influência da deficiência de estrógeno na expressão gênica de <i>ESR1</i> e <i>ESR2</i> na região odontogênica	91
5 DISCUSSÃO	93

5.1 Desenho do estudo e tamanho amostral.....	95
5.2 Região odontogênica de dentes com crescimento contínuo – incisivos inferiores do modelo murino	99
5.3 Taxa de erupção dentária e a deficiência de estrógeno	101
5.4 Imunoexpressão e expressão gênica na região odontogênica na deficiência de estrógeno	104
5.5 Limitações do estudo	109
6 CONCLUSÃO	111
REFERÊNCIAS	115
ANEXOS.....	135
APÊNDICES	141

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A erupção dentária é um processo fisiológico definido como a migração do dente em desenvolvimento intraósseo até a sua emergência e posicionamento funcional na cavidade bucal (Marks e Schroeder, 1996). Esse processo, pode ser conveniente, mesmo que arbitrariamente, dividido em estágios, abrangendo fases pré-, eruptivas e pós-eruptivas (Marks e Schroeder, 1996; Jain e Rathee, 2019). A fase pré-eruptiva se inicia logo nas etapas iniciais da odontogênese, onde a formação coronária exige o desenvolvimento dimensional intraósseo. Assim, quando a porção coronária se completa, a fase eruptiva ou também chamada de pré-funcional, se inicia (Marks e Schroeder, 1996; Jain e Rathee, 2019). Sugere-se que nesta fase, quando ocorre a migração do dente em desenvolvimento intraósseo em direção à sua posição funcional, a erupção dentária seja mediada pela associação da remodelação óssea (Marks Jr e Cahill, 1984; Marks e Cahill, 1987) e desenvolvimento radicular (Proffit e Frazier-Bowers, 2009).

Diversos pesquisadores ressaltam que a teoria da remodelação óssea seja a mais condizente com o processo de erupção dentária devido a sinalização proveniente do folículo dentário (Cahill e Marks, 1980; Marks e Cahill, 1984; Marks e Cahill, 1987; Zhou et al., 2019), que induz à alta expressão de marcadores relacionados a formação (RUNX2, OSX, ALP, OCN, CX43) e reabsorção óssea (OPG, RANKL, MCP-1, CSF-1). O produto da expressão dos genes que expressam a formação e a reabsorção óssea da via de erupção, conseqüentemente, impulsionam e guiam o germe até a ruptura gengival (Arai et al., 1999; Wise; Fan 1989; Que; Lumpkin; Wise, 1999; Wise et al., 2005; Wise; Yao, 2006; Wise; Yao; Henk, 2007; Wise e King, 2008; Liu e Wise, 2008; Wise, 2009; Yao et al., 2010; Wise et al., 2011; Yao et al., 2013, Chen et al., 2016; Zhou et al., 2019).

A teoria da remodelação óssea, no entanto, permanece viável apenas nas fases iniciais da odontogênese uma vez que, parte do folículo é perdido após a emergência gengival (Marks e Schroeder, 1996). Assim, a teoria de crescimento radicular, fibras colágenas do ligamento periodontal e pressão de fluxo sanguíneo na região de periápice são descritas como as principais teorias auxiliares nas fases eruptivas subsequentes (Cheek et al., 2002; Dorotheou et al., 2017; Jain e Rathee, 2019).

Estudos realizados em roedores, também relacionaram a formação e a renovação do ligamento periodontal à erupção contínua de incisivos (Marks e Schroeder, 1996). Tais mecanismos, ainda que incertos, são hipóteses para descrever o processo de erupção durante toda a vida do órgão dentário (Berkovitz e Thomas, 1969; Berkovitz, 1971). Mesmo que a taxa de erupção dentária tenha uma redução relevante, o crescimento e desenvolvimento da face, a compensação do desgaste oclusal causado pelo atrito ou até mesmo a extrusão causada pela perda do dente antagonista, sempre estarão em constante renovação, acompanhado o desenvolvimento e modificação dos arcos dentários (Almonaitiene, et al., 2010; Jain e Rathee, 2019).

Além dos mecanismos fisiológicos da erupção dentária, vários fatores locais, ambientais e sistêmicos também podem estar associados à desvios nesse processo (Wise et al., 2002; Suri; Gagari; Vastardis, 2004; Huber; Suri; Taneja, 2008; Almonaitiene; Balciuniene; Tutkuvienė, 2010; Um Lan et al., 2016; Verma et al., 2017; Jain e Rathee, 2019). Diversos estudos têm ressaltado que alterações sistêmicas e/ou síndromes, principalmente as decorrentes do desequilíbrio hormonal ocasionam desordens significativas do processo de erupção dentária (Lorimer, 1972; Roberts et al., 1986; Silva et al., 2016; Subramanian et al., 2016; Vucic et al., 2017). A hiperfunção da glândula pituitária e os tumores corticais adrenais já foram descritos com potencial de acarretar alterações na taxa de erupção dentária (Lorimer 1972; Chandna e Bathla, 2011; Litsas, 2015; Vasconcelos e Vasconcelos, 2016; Davidopoulou e Chatzigianni, 2017). No entanto, embora haja estudos diversos referentes as condições de hipofunção da glândula pituitária e a consequente diminuição dos níveis séricos hormonais excretados por ela (Almonaitiene, et al., 2010; Scaramucci et al., 2011; Davidopoulou e Chatzigianni, 2017; Vucic et al., 2017; Tokavanich et al., 2019), as evidências científicas sobre os hormônios sexuais ainda permanecem escassos, principalmente quando relacionada a erupção dentária.

É importante salientar as possíveis alterações fisiológicas da taxa de erupção dentária mediante ao desequilíbrio dos hormônios sexuais, uma vez que esses hormônios desempenham um papel crítico em muitos tecidos. O desenvolvimento do organismo é particularmente vulnerável à exposição a substâncias que mimetizam ação hormonal (Kabir, Rahman, Rahman, 2015; Kiyama e Wada-Kiyama, 2015; Darbre

et al., 2017). Várias classes de substâncias químicas, como pesticidas, fungicidas, produtos químicos industriais, plastificantes, nonilfenóis, metais, agentes farmacêuticos e fitoestrogênios podem ser classificados como desreguladores endócrinos (Yilmaz et al., 2019). Em geral, um desregulador endócrino pode apresentar os seguintes mecanismos de ação: ligação em receptor hormonal, interação com enzimas que sintetizam ou metabolizam hormônios, alteração da liberação hipotalâmica-hipofisária de hormônios e/ou alteração da transdução de sinais (Kabir, Rahman, Rahman, 2015; Kiyama e Wada-Kiyama, 2015; Darbre et al., 2017; Yilmaz et al., 2019). Nesse sentido, faz-se importante pesquisas que demonstrem interesse na compreensão dos mecanismos de ação que o desequilíbrio hormonal pode ocasionar nos indivíduos, principalmente em atividades que envolvam o estrógeno.

O estrógeno é um hormônio presente e ativo do período embrionário (Ben-Hur et al., 1993) à puberdade (Varlinskaya; Vetter-O'Hagen; Spear, 2013). Este hormônio está presente em maior quantidade no sexo feminino, sendo produzido principalmente pelos ovários. No entanto, homens também possuem níveis de estrógeno, que é produzido pelo tecido adiposo e cérebro (Kula et al., 2005; Saito; Cui, 2018). Atualmente é possível correlacionar a participação do estrógeno na reprodução masculina e em vários outros sistemas, incluindo os sistemas neuroendócrino, vascular, esquelético e imunológico de ambos os sexos (Almeida et al., 2017; Christ et al., 2018; Patel et al., 2018). Além disso, também está associado a diversas doenças diferentes como a obesidade, distúrbio metabólico, uma variedade de cânceres, osteoporose, lúpus eritematoso, endometriose e miomas uterinos (Mauvais-Jarvis, Clegg, Hevener, 2013; Clegg et al., 2017; Leeners et al., 2017; Moulton, 2018; Patel et al., 2018; Piccinato et al., 2016; Reis et al., 2016; Sukocheva, 2018; Yoshida, Wang, Stern, 2019).

A via clássica pela qual o estrógeno realiza sua ação é mediada por seus receptores intracelulares (Cato et al., 2002), os quais pertencem a família de receptores nucleares e operam como fatores de transcrição quando induzidos por seus ligantes (Nelson e Habibi, 2013). Existem três tipos de receptores de estrógeno (ERs) descritos, sendo os mais prevalentes o receptor de estrógeno tipo alpha (ER α) e o receptor de estrógeno tipo beta (ER β), codificados pelos genes *ESR1* e *ESR2*,

respectivamente (Green et al., 1986; Kuiper et al., 1996; Prossnitz et al., 2007; Paterni et al., 2014). A distribuição tecidual destes receptores é variável e ambos podem ser expressos nos mesmos tecidos ou em tecidos distintos e em níveis variados (Nilsson et al., 2001; Eyster, 2016; Hamilton et al., 2017). Assim, atualmente as pesquisas tem se voltado bastante para estudos relacionados a esses receptores (Katzenellenbogen et al., 2000; Hall et al., 2001; Lee et al., 2006; Tetel e Pfaff, 2010; Barros e Gustafsson, 2011; Hess et al., 2011; Planey et al., 2014; Eyster, 2016).

A expressão ER α prevalece em regiões do útero, glândula mamária, células intersticiais de Leydig, epidídimo, osso, musculo esquelético, fígado, rins, tecido adiposo e glândula pituitária com os níveis mais altos. Já o ER β possui uma expressão mais específica (Levin, 2015; Hewitt et al., 2016; Hamilton et al., 2017). Contudo, pode ser descrito em regiões relacionadas aos ovários, pulmão, próstata, glândulas salivares e medula óssea (Kos et al., 2001; Gruber et al., 2002; Hong et al., 2004; Nilsson e Gustafsson, 2011; Hamilton et al., 2017; Balla et al., 2019; Tang et al., 2019). Pesquisas recentes demonstraram que os ER β , podem ser expressos em uma linhagem celular com diferenciação osteogênica em células da polpa, sugerindo seu efeito pró-osteogênico (Manokawinchoke et al., 2016; Lu et al., 2016; Alhodhodi et al., 2017). No entanto, é válido ressaltar que ainda não é esclarecido como a deficiência de estrógeno e seus receptores podem influenciar na odontogênese e consequentemente taxa de erupção dentária.

Um estudo realizado por Lorimier (1972), foi o único estudo a relacionar a taxa de erupção dentária e os hormônios sexuais por meio de condições de hipo- e hipergonadismo. O estudo foi realizado em ratas heterogêneas *Sprague-Dawley* de ambos sexos com 90 dias de idade. Os animais foram divididos em quatro grupos, sendo metade dessas, submetidos a diminuição da liberação dos hormônios sexuais por meio da cirurgia de ovariectomia e castração bilateral. O grupo controle foi submetido apenas ao acompanhamento, sem realização de cirurgia fictícia. A taxa de erupção dentária foi realizada em ambos incisivos superiores em condições normofuncionais durante cinco semanas. No entanto, após metade do período de acompanhamento, metade dos animais dos grupos controle, bem como, metade dos animais dos grupos experimentais, foram submetidos a reposição hormonal.

O estudo de Lorimier (1972) demonstrou um retardo da taxa de erupção dentária de aproximadamente 10% no grupo submetido a castração e 7% do grupo submetido a ovariectomia, quando comparados aos grupos controle. Assim, o estudo pôde supor que a testosterona e o estradiol, juntamente com a cortisona e a tiroxina, poderiam ser responsáveis por aproximadamente 60% da erupção dos incisivos. Além disso, visto que os hormônios sexuais são conhecidos por colaborar no processo de formação de alguns tecidos, destacou-se a suposição que esses hormônios também poderiam causar efeitos semelhantes sobre os tecidos relacionados ao processo de erupção, quando analisados separadamente. Lorimier (1972) também demonstrou a interação da reposição hormonal realizada com administração de estrógeno, que acarretou uma aceleração da taxa de erupção dentária, bem como a sobredosagem hormonal que acarretou um retardo da taxa de erupção.

Parte dos achados do estudo de Lorimier (1972) corroboram com o estudo de Roberts et al. (1986) que também descreveram um possível efeito bifásico do estrógeno no desenvolvimento da dentição em humanos. A ação deste hormônio demonstrou antecipar a erupção dentária em meninas no período pré-puberal, enquanto níveis muito elevados, demonstram retardar o processo. Alguns estudos posteriores, realizados em indivíduos portadores da Síndrome de Turner, uma condição genética com consequente deficiência de estrógeno, também identificaram distúrbios na erupção dentária. No entanto, em fases finais da emergência do dente na cavidade bucal, o processo apresentou-se discretamente adiantado quando comparados a pacientes sem alterações sindrômicas (Filipsson, Lindsten, Almqvist, 1965; Midtbo e Halse, 1992; Hass et al., 2001; Ahiko et al., 2019). O estudo de Lorimier (1972), ainda faz a ressalva da possibilidade de ação do estrógeno em alguns tecidos do corpo serem replicados aos tecidos relacionados ao processo de erupção dentária. Assim como no estudo de Midtbo e Halse (1992), relaciona o retardo de crescimento craniofacial com possíveis atrasos no processo de erupção dentária.

Evidencia-se que pesquisas sejam realizadas para relacionar a influência da deficiência de estrógeno na erupção dentária, tendo em vista que a literatura se encontra limitada quando abordado tal assunto. Deste modo, com o objetivo de contribuir com as evidências científicas sobre os mecanismos de ação da deficiência

de estrógeno nos tecidos bucais como também, contribuir para orientação de indivíduos e/ou populações na implementação de estratégias preventivas, diagnósticas e terapêuticas mais eficientes relacionadas a taxa de erupção, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da deficiência de estrógeno na taxa de erupção dentária.

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

Objetivo geral:

- Avaliar a influência da deficiência de estrógeno na taxa de erupção dentária, em modelo murino.

Objetivos específicos:

- Avaliar a taxa de erupção dentária sob condição de deficiência de estrógeno.
- Avaliar a imunoexpressão de ER α e ER β na região odontogênica sob condição de deficiência de estrógeno.
- Avaliar a expressão gênica de ER α (*ESR1*) e ER β (*ESR2*) na região odontogênica sob condição de deficiência de estrógeno.

Material e Métodos

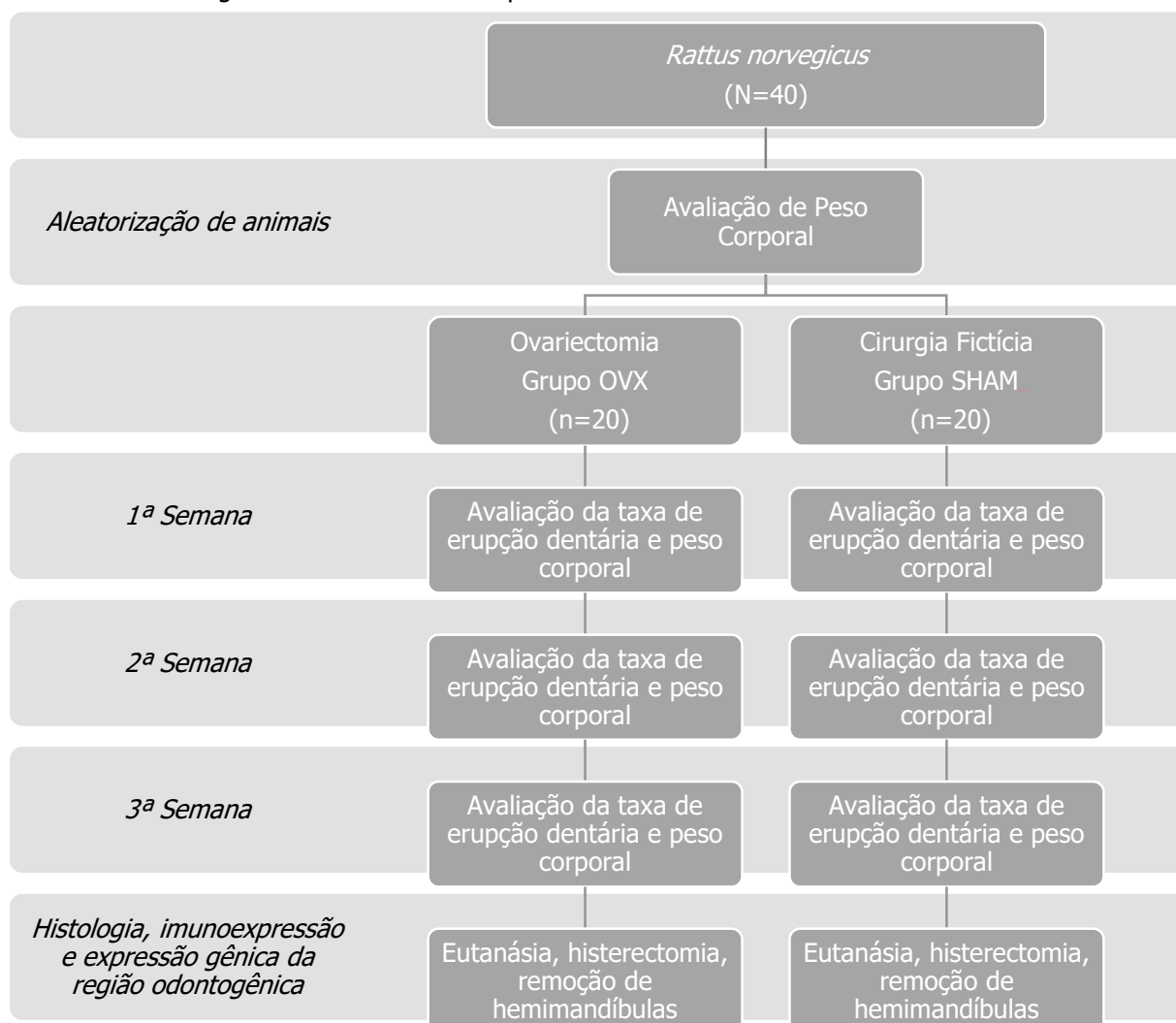
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FORP/USP), tendo sido aprovado pelo número de protocolo 2018.1.40.58.3 (ANEXO A).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizado um estudo *in vivo*, longitudinal, prospectivo, paralelo e experimental de caráter descritivo e estatístico. Nesse cenário, 40 ratas da espécie *Rattus norvegicus* e linhagem Wistar Hannover, em período pré-puberal, foram submetidas a uma intervenção cirúrgica, na qual após aleatorização da intervenção foram divididas em dois grupos. Em um grupo, houve a incisão bilateral dos ovários com consequente diminuição da liberação endógena de estrógeno (grupo OVX). No outro grupo, houve apenas a simulação cirúrgica sem qualquer consequência para liberação endógena de estrógeno (grupo SHAM). Após o procedimento cirúrgico, as ratas foram avaliadas durante um período de 21 dias consecutivos. Durante esse período, avaliações quanto a taxa de erupção dentária e peso corporal foram realizadas de forma padronizada e sistematizada. Após o período de avaliações, os animais foram submetidos a eutanásia e à uma nova intervenção cirúrgica pós-morte. Essa intervenção foi realizada na região abdominal e região de mandíbula. Na região abdominal, foi realizada a remoção uterina para posterior análise da atrofia por meio do peso. Na região de mandíbula, foi realizada a remoção das hemimandíbulas para identificação histológica, reação de imunohistoquímica e quantificação da expressão gênica dos genes codificadores de ER α e ER β da região odontogênica (Figura 1).

FIGURA 1. Fluxograma - Delineamento experimental

3.3 AMOSTRA E AMOSTRAGEM DOS ANIMAIS

O tamanho da amostra foi estabelecido de acordo com a referência o estudo de Lorimier (1972). No grupo submetido a cirurgia de ovariectomia houve uma taxa de erupção dentária média de 2.54 (0.19) mm, enquanto no grupo controle foi observado uma taxa de erupção dentária média de 2.72 (0.20) mm. Considerando os valores de média e desvio padrão supracitados, o cálculo amostral para validar a diferença entre duas amostras independentes foi realizado por meio do software G*Power® 3.1.9.2 (Düsseldorf, Alemanha). Para o cálculo foi usado como premissa um β valor de 0.20, um α valor de 0.05 e uma taxa de alocação de 1:1. O número obtido após o cálculo foi de 20 animais por grupo.

Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto, onde foram selecionados de acordo com idade e boa

saúde geral. Os animais foram solicitados com de 21 dias de vida pós-uterino pois, conforme respalda a literatura, corresponde ao período pré-puberal. A puberdade em ratas dessa linhagem se inicia no 35º ao 55º dia de vida pós-uterina, e conseqüentemente, há um pico de liberação de estrógeno da raça neste intervalo de tempo (Ojeda et al., 1976). Foram excluídos do estudo, animais que apresentaram insucesso nos procedimentos cirúrgicos, que apresentaram fraturas dentárias durante avaliação da taxa de erupção e que vieram a óbito antes da avaliação final. Desse modo, os animais foram codificados e posteriormente procedeu-se à randomização em dois grupos conforme discriminado na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimental e controle em função da intervenção sofrida

Grupos	Procedimento	n
OVX	Ovariectomia	20 animais
SHAM	Cirurgia fictícia	20 animais

Os animais foram acondicionados no Biotério II da FORP/USP, em ambiente com temperatura controlada e ciclo de 12 horas claro-escuro, com livre demanda à ração (Labina Purina®/Agribands do Brasil LTDA, Paulínia, BR) e água filtrada.

Visando a adaptação dos animais, procedeu-se o procedimento cirúrgico quatro dias após da chegada dos animais.

3.4 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DO PESO CORPORAL

O peso corporal foi registrado antes do procedimento cirúrgico e antes de todas as intervenções de avaliação quantitativa de taxa de erupção dentária. Os animais foram pesados sempre na mesma sequência e horário. A pesagem foi realizada por meio de balança digital (Urano®, Canos, BR), também disponível no Biotério II FORP/USP.

3.5 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

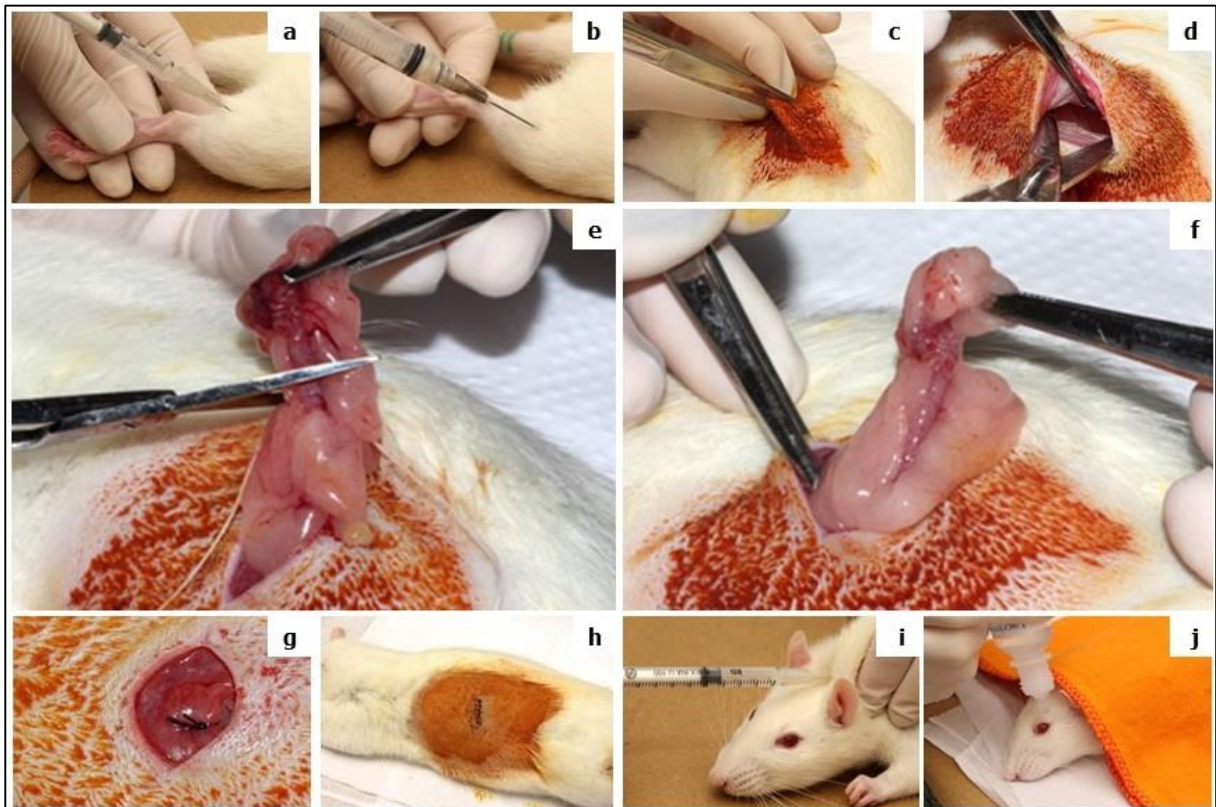
Os procedimentos cirúrgicos foram realizados por meio de anestesia geral, via intramuscular. Os fármacos utilizados foram, o Cloridrato de Ketamina a 10% (Cetamin® 10%), na dosagem de 55mg/kg e o Cloridrato de Xilazina a 2% (Xilasyn®),

na dosagem de 10mg/kg. Logo, procedeu-se a antissepsia da região lateral de tronco onde estão localizados os ovários. A antissepsia foi realizada por meio da tricotomia da região e posteriormente, a fricção delicada com a solução de iodopovidona à base de álcool. Após o procedimento cirúrgico houve a administração medicação antibiótica, anti-inflamatória e analgésica. Os fármacos utilizados foram a Benzilpenicilina Benzatina (Pentabiótico®) na dosagem de 24.000UI/kg; o Flunixinolida (Aplonal® 1%) na dosagem de 1mg/kg, ambos por via intramuscular e, o Tramadol (Cronidor® 2%), na dosagem de 1mg/kg, via subcutânea. O Tramadol também administrado novamente 24 horas após o procedimento cirúrgico.

3.5.1 OVARIETOMIA E CIRURGIA FICTÍCIA

No grupo OVX, visando a deficiência na produção do estrógeno pelos ovários, foi realizada ligadura seguida de excisão cirúrgica bilateral dos mesmos (ovariectomia), conforme descrito no protocolo de Weitzmann e Pacifi (2006). No grupo SHAM, foi realizada a cirurgia de ovariectomia fictícia, na qual os ovários foram movimentados e devolvidos intactos à posição original, conforme descrito por Orrico et al. (2005) e Romualdo et al. (2018).

O sucesso do procedimento cirúrgico confirmou-se pela sobrevivência adequada dos animais, aumento do peso corporal gradual durante o período de experimentação e pela atrofia uterina após eutanásia. A diminuição da liberação endógena de estrógeno, ocasionada devido à ovariectomia, proporciona diferenças significativas de variáveis relacionadas ao peso corporal e peso útero. Sendo assim, o grupo OVX tende a apresentar aumento do peso corporal e uma diminuição do peso do útero quando comparado ao grupo SHAM (Chen et al., 2014). O peso do útero foi registrado por meio da balança de precisão (Uni Bloc®, Filadélfia, EUA) disponível no laboratório de Biologia Molecular da FORP/USP. O procedimento cirúrgico encontra-se ilustrado na figura 2.

FIGURA 2. Sequência de procedimentos cirúrgicos: Ovariectomia e Cirurgia Fictícia

Legenda: a. Anestesia intramuscular; b. Medicação pré-operatória; c. Incisão; d. Divulsão de tecidos; e. Ovariectomia: ligadura das tubas uterinas e excisão bilateral dos ovários; f. Cirurgia fictícia: os ovários foram movimentados e devolvidos a posição original; g. Sutura do tecido abdominal com fio reabsorvível; h. Sutura tecido epitelial; i. Medicação pós-operatória; j. Cuidados pós-operatórios. Fotos gentilmente cedidas pela Dr^a. Priscilla Romualdo.

3.6 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA TAXA DE ERUPÇÃO DENTÁRIA

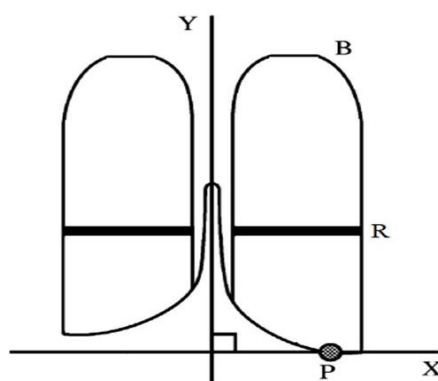
A avaliação quantitativa da taxa de erupção dentária iniciou-se a partir do 35º dia de vida pós-uterina. O procedimento foi realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, no Departamento de Física e Química da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto (FCFRP/USP). Para quantificação, as segundas, quartas e sextas-feiras foram definidas, possibilitando um intervalo de 48 e 72 horas entre as intervenções. A avaliação quantitativa foi realizada por um período de 21 dias consecutivos, totalizando 8 intervenções (Lee et al., 2002; Silva et al., 2016). Cada sessão foi realizada sempre na mesma hora do dia e seguindo a mesma sequência de animais (Lee et al., 2002; Drevensek et al., 2009; Silva et al., 2016).

A imobilização dos animais no momento da avaliação quantitativa da taxa de erupção dentária foi realizada por sedação mínima via intramuscular (Lee et al., 2002). Os fármacos utilizados em concentração diminuída, garantiram a estabilização do animal bem como a ausência de toxicidade e sofrimento. Foram administrados Cloridrato de Ketamina a 10% (40 mg/Kg) e Cloridrato de Xilazina a 2% (5mg/kg), previamente às intervenções. Uma vez sedados, os animais também foram posicionados de forma padronizada. Assim, foi utilizado um dispositivo previamente adaptado, onde os incisivos superiores foram estabilizados firmemente por um fio de barbante preso a um par de hastes laterais a cabeça, permitindo que os incisivos inferiores, também estabilizados, ficassem paralelos ao plano horizontal (Figura 3a e b). A taxa de erupção dentária foi realizada em ambos incisivos centrais inferiores, devido à erupção dentária contínua e comodidade de visualização clínica (Gelarch et al., 2000; Lee et al., 2002; Sasaki et al., 2003; Shimada et al., 2006; Gomes et al., 2013; Araújo et al., 2014; Silva et al., 2016). O comprimento dos incisivos inferiores foi registrado com auxílio do estereomicroscópio óptico (Zeiss CL1500 ECO, BioSurplus®, San Diego, EUA) e simultaneamente, registro de imagem realizado por meio de câmera acoplada ao equipamento (Canon EOS 1000D, Canon do Brasil Indústria e Comércio|Ltda, São Paulo, BR). Uma régua milimetrada (Maquira®, Maringá, BR) também foi posicionada com objetivo de orientação, em milímetros, no momento da tomada fotográfica (Figura 3b).

A partir da padronização na posição do animal, foram instituídos parâmetros anatômicos referenciais para que a taxa de erupção dentária fosse registrada sempre

nas mesmas condições dos dias anteriores (Lee et al., 2002; Gomes et al., 2013; Silva et al., 2016). Delimitou-se o ponto mais apical da margem gengival, denominado de ponto (P) e os bordos incisais (B) de ambos incisivos inferiores. É válido ressaltar, que devido crescimento contínuo de incisivos de roedores, o desgaste fisiológico poderia influenciar nos valores reais da taxa de erupção (Gerlach et al., 2000; Omar et al., 2011). Então, um sulco linear no sentido mesio/distal na face vestibular de ambos incisivos inferiores, 2 mm aquém da papila gengival interdental, denominada marca de referência (R) foi realizado (Figura 4) (Lee et al., 2002; Gomes et al., 2013; Silva et al., 2016). Os sulcos correspondentes as marcas de referência, foram realizados com disco diamantado dupla face 7011 (KG Sorensen[®], Cotia, BR) de 0,18mm de espessura. Foi considerado o ponto mediano da marca na superfície, devido à espessura do disco (Drevensek et al., 2009).

FIGURA 4. Parâmetros anatômicos referenciais delimitados nos incisivos inferiores dos modelos experimentais (OVX e SHAM)

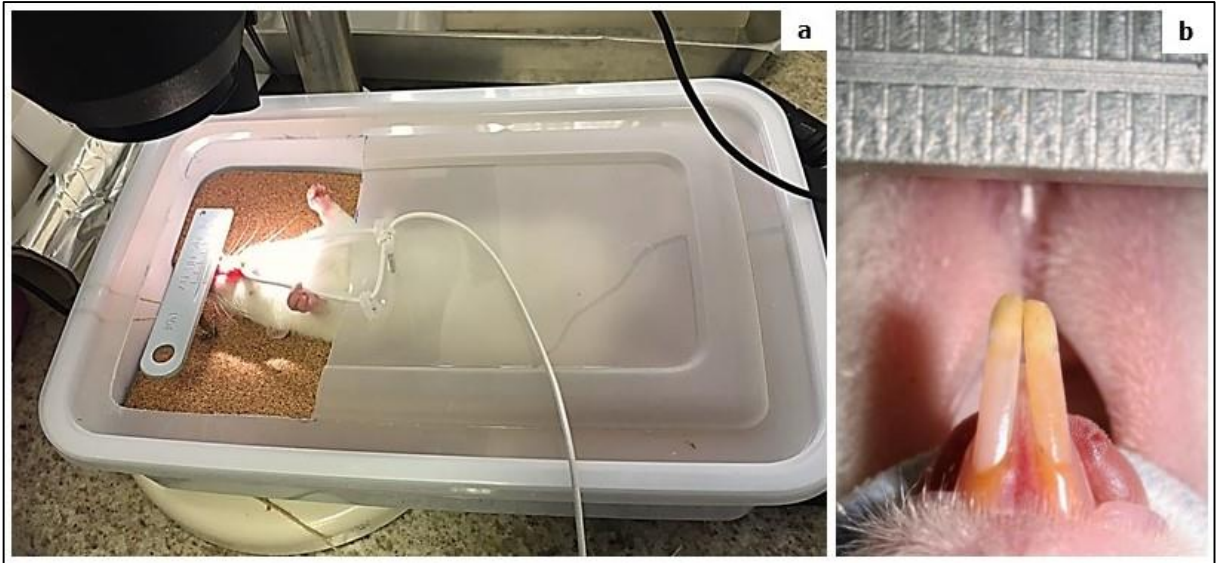


Legenda: Ponto P - ponto mais apical da margem gengival; ponto R - sulco mesio/distal realizado na face vestibular e ponto B - bordo incisal.

Fonte: Adaptado de Lee et al. (2002).

Mesmo com a padronização dos pontos referenciais, os autores ainda sugerem que a taxa de erupção seja realizada em condições de hipo- e hiperfunção (Gerlach et al., 2000; Gerlach et al., 2002; Lee et al., 2002). Isso se justifica uma vez que, os resultados poderiam ser sutis a ponto de não serem identificados em condição de normofunção (Gerlach et al., 2000; Gerlach et al., 2002; Gomes et al., 2013). Assim, a mensuração da taxa de erupção foi realizada em condições de hipo- e hiperfunção.

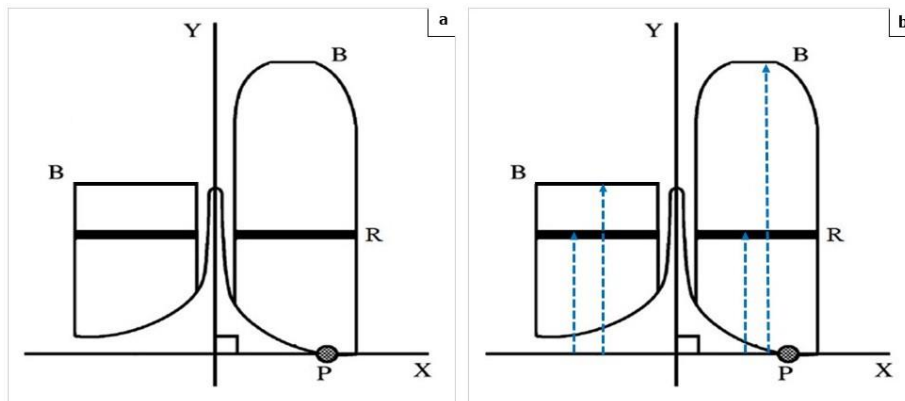
FIGURA 3. Padronização das tomadas fotográficas para mensuração da taxa de erupção dentária em modelo experimental (OVX e SHAM)



Legenda: a. Estabilização protetora adjuvante à anestesia geral realizada para padronização do animal.
b. Visão dos incisivos inferiores de acordo com a estabilização de cabeça e pescoço.

A condição de hipofunção do incisivo inferior direito foi realizada pelo ajuste a nível da papila gengival (Lee et al., 2002; Gomes et al., 2013; Silva et al., 2016), totalizando quatro valores em relação ao ponto P (Figura 5a e b).

FIGURA 5. Delimitação de pontos referenciais iniciais após o ajuste de bordo incisal direito



Legenda: a. Ajuste incisal do incisivo central inferior direito; b. Variáveis resultantes das delimitações em relação ao ponto P.

Fonte: Adaptado de Lee et al. (2002).

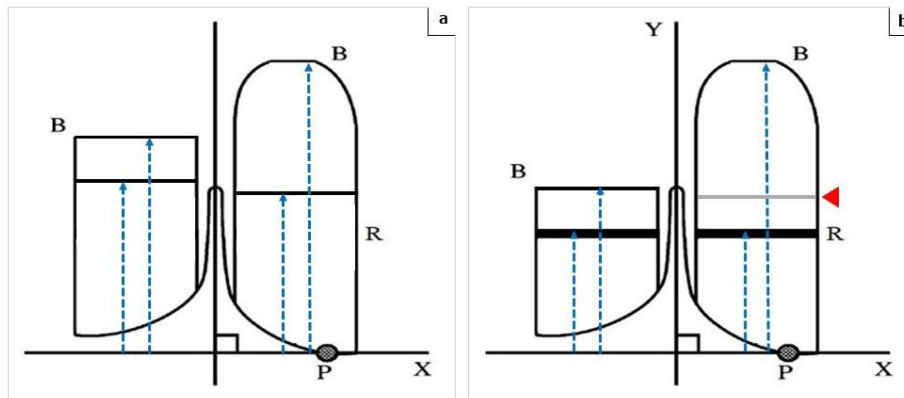
Em resumo, os pontos referenciais e as diferentes condições funcionais de erupção seguem dispostos na tabela 2.

TABELA 2. Valores resultantes da avaliação da taxa de erupção dentária

Incisivo central inferior direito - Hipofuncional	Incisivo central inferior esquerdo - Hiperfuncional
D ₁ - distância do ponto (P) até a marca de referência (R)	D ₃ - distância do ponto (P) até a marca de referência (R)
D ₂ - distância do ponto (P) até o bordo incisal ajustado (B)	D ₄ - distância do ponto (P) até o bordo incisal (B)

Após 24 ou 72 horas o registro do deslocamento dos pontos referenciais foram mensurados e novos pontos anatômicos referenciais foram restabelecidos (Gerlach et al., 2000; Lee et al., 2002; Omar et al., 2011). Desta forma, a marca de referência (R) foi anulada e novos parâmetros referenciais foram definidos bem como, um novo registro de bordo incisal direito, realizado (Gerlach et al., 2000; Lee et al., 2002; Omar et al., 2011) (Figura 6).

FIGURA 6. Mensuração dos pontos referenciais após 48/72 horas e restabelecimento da condição inicial

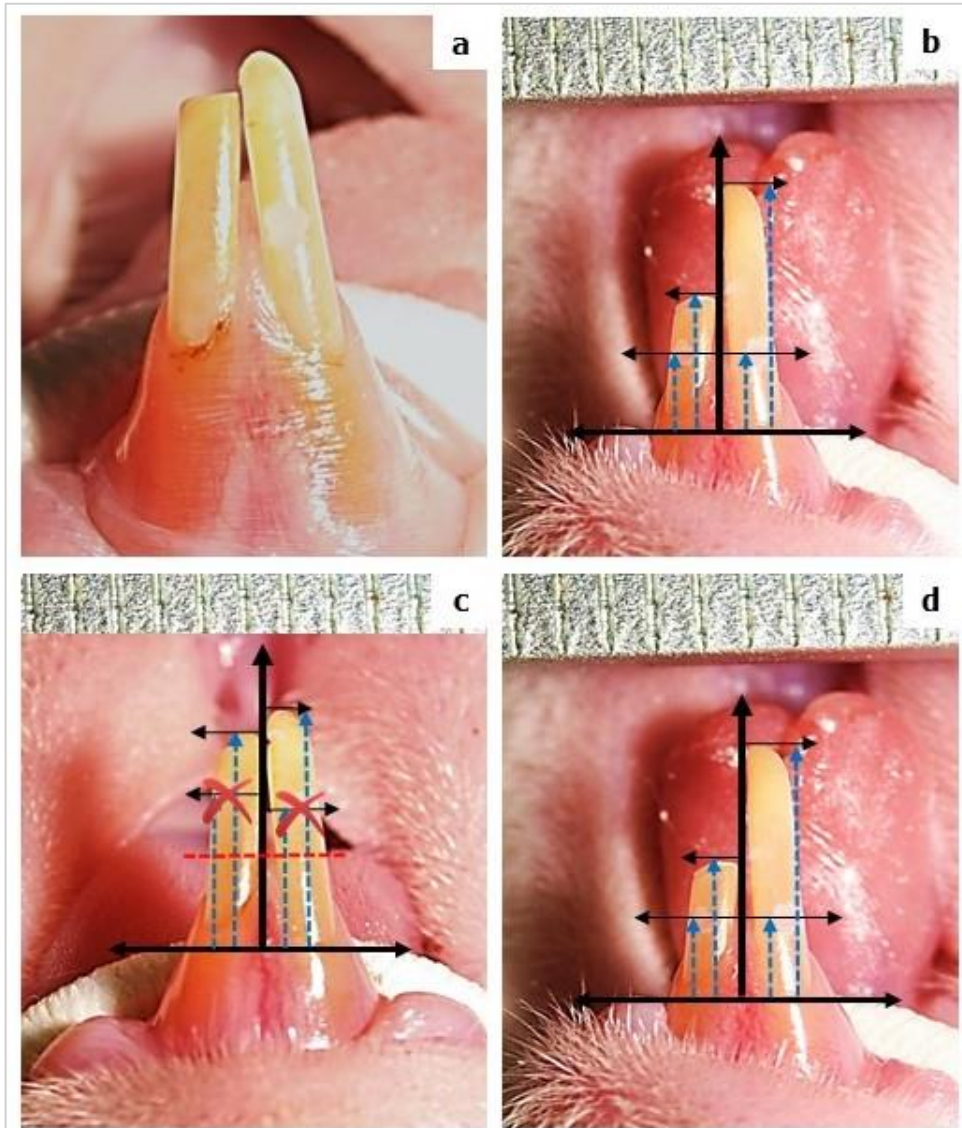


Legenda: a. Mensuração dos pontos após 48/72 horas. b. Restabelecimento dos pontos anatômicos referenciais iniciais. A seta em vermelho indica a marcação desconsiderada.

Fonte: Adaptado de Lee et al. (2002).

As imagens foram inseridas sob coordenadas (x e y) e avaliadas por meio do software ImageJ[®] version 1.6. (National Institutes of Health, Bethesda, EUA). Deste modo, dados correspondentes ao comprimento dos incisivos inferiores foram dispostos em tabela e a diferença entre o aspecto inicial e crescimento após de 48 e/ou 72 horas foram calculados (Lorimier, 1972). A figura 7, retrata a sequência dos procedimentos realizados na etapa de avaliação da taxa de erupção.

FIGURA 7. Método sequencial para avaliação quantitativa da taxa de erupção dentária



Legenda: a. Aspecto inicial; b. Ajuste incisal e padronização dos pontos referenciais; c. Aspecto após 48 ou 72 horas; d. Reajuste incisal.

3.7 EUTANÁSIA

A eutanásia ocorreu ao final da terceira semana de mensuração da taxa de erupção, onde os animais estavam com 56 dias de vida pós-uterina. A eutanásia foi realizada seguindo as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, informada na publicação no Diário Oficial da União (22/02/2018), seção I, onde a Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018, determina a Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA e revoga a Resolução Normativa nº 13, de 20 de setembro de 2013, apontando que:

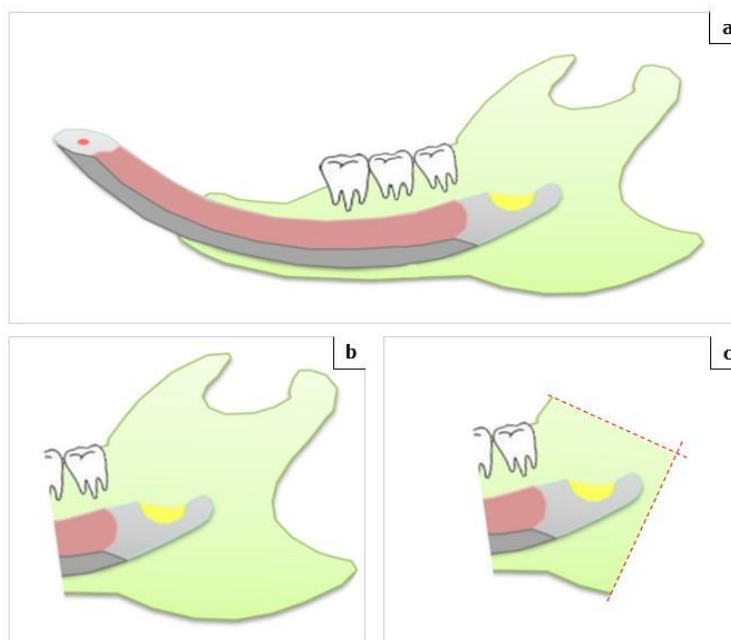
"Os anestésicos dissociativos não devem ser utilizados como agentes únicos para realização de eutanásia porque não promovem inconsciência, mas apenas dissociação do córtex cerebral. Podem causar excitação, catalepsia e convulsão em altas doses e a dose letal é muito alta. Entretanto, para eutanásia, quando associados aos agonistas de adrenoceptores de alpha-2, como a xilazina, podem ser utilizados para contenção química de animais indóceis, seguido de sobredosagem com a própria associação ou complementação com anestésicos gerais. A sobredosagem da combinação de anestésicos dissociativos e agonistas de adrenoceptores de alpha-2 pode ser utilizada para eutanásia de roedores".

Portanto, a indução da eutanásia nos animais do presente estudo foi realizada por sobredose anestésica, por meio da associação de Cloridrato de Ketamina (300mg/kg de peso) e Cloridrato de Xilazina (30mg/kg de peso), as quais estão disponíveis na página da CEUA, no site www.forp.usp.br. Adicionalmente, conforme sugestão da CEUA, para garantir otimização dos procedimentos, a decapitação também foi adotada.

Após a eutanásia dos animais, as mandíbulas foram removidas, dissecadas e seccionadas em hemimandíbulas. Metade dos espécimes foram destinados a análise da região odontogênica, por meio da técnica de coloração com hematoxilina e eosina e imunohistoquímica. A outra metade foi destinada a análise da expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real quantitativo.

Para análise histológica da região odontogênica, metade das hemimandíbulas foram processadas de forma íntegra. A outra metade foi novamente seccionada no sentido transversal na região mesial do segundo molar inferior (Figura 8a e b). Para análise da expressão gênica, todos os espécimes foram submetidos a secção do côndilo, processo coronoide e ramo da mandíbula com objetivo de isolar a região odontogênica (Figura 8c, d, e). A secção da hemimandíbula foi realizada com disco diamantado dupla face 7011 (KG Sorensen, Cotia, BR) de 0,18mm de espessura.

FIGURA 8. Desenho esquemático da hemimandíbula íntegra e dos espécimes isolados



Legenda: a. Desenho esquemático representando a hemimandíbula ao longo do eixo do dente; b. Desenho esquemático representando a hemimandíbula seccionada no sentido transversal; c. desenho esquemático da região odontogênica isolada para análise de expressão gênica.

Fonte: Adaptado de Araújo et al. (2014).

3.8 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

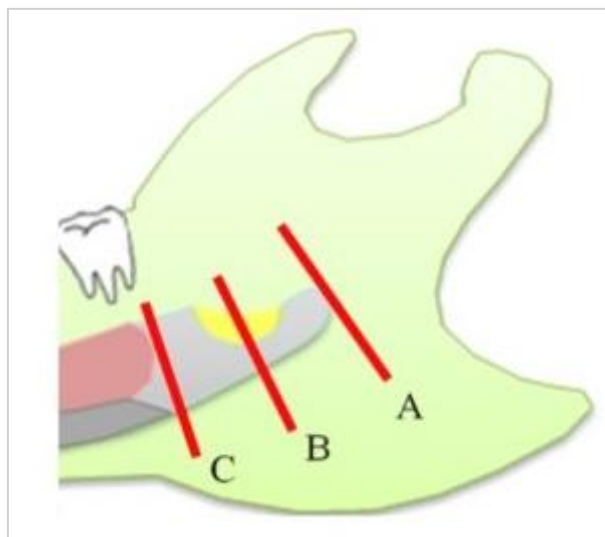
PROCESSAMENTO HISTOTÉCNICO

Os espécimes foram fixados por imersão em formol tamponado a 10% por 24 horas à temperatura ambiente e, depois, lavados por aproximadamente, 4 horas em água corrente. Em seguida, para a desmineralização, foi utilizada solução à base de EDTA a 4,13% (pH 7-7,4). Os espécimes foram mantidos nesta solução, à temperatura

ambiente, trocada semanalmente, até sua completa desmineralização. O grau de desmineralização das estruturas foi testado por meio da penetração de agulha nos tecidos, para verificação da sua consistência. Uma vez que os espécimes completaram o processo de descalcificação, foram submetidas ao processamento histotécnico de rotina, sendo lavadas em água corrente por 2 horas, desidratadas em álcool de concentrações crescentes (70%, 90%, 95% e 100% por 60 minutos cada), diafanizadas em xilol (3 banhos de 60 minutos cada) e incluídas em parafina. A posição de inclusão dos espécimes foi padronizada segundo a secção. As hemimandíbulas íntegras foram dispostas com a superfície vestibular voltada para região do corte, e estes foram realizados no sentido longitudinal. As hemimandíbulas seccionadas, foram dispostas com a superfície mesial do segundo molar inferior voltado para a superfície de corte. Assim, os cortes histológicos também foram realizados no sentido longitudinal a partir da porção final à porção inicial da região odontogênica (Figura 9).

Os blocos parafinados contendo os espécimes foram cortados em micrótomo (Leica RM2145, Leica Microsystems®, Wetzlar, Alemanha) no sentido anteroposterior, semiserrilhado, com espessura de 3 μ m. A partir de cada bloco foram obtidas trinta lâminas histológicas contendo três e dois cortes cada, respectivamente.

FIGURA 9. Desenho esquemático da região odontogênica do incisivo inferior de roedores



Legenda: A. porção inicial; B. porção média; C. porção final da região odontogênica. Os cortes foram realizados a partir da região C para região A. Fonte: Araújo et al. (2014).

3.8.1 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A identificação histológica foi realizada com o objetivo de facilitar a interpretação anatômica e melhorar a compreensão da análise por reação de imunohistoquímica. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina, montadas em bálsamo do Canadá e analisadas em microscópio de luz comum com aumento de 25x a 400x. Foram selecionadas porções médias, correspondentes à fase de histo- e morfodiferenciação (fase de campânula) e, porção final da região odontogênica representando a odontogênese completa.

3.8.2 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

Para avaliação da presença e localização do ER α e ER β na região odontogênica, os cortes sequenciais foram colocados sobre lâminas devidamente revestidas com organo-silano (StarFrost[®], Lowestoft, Reino Unido) para realização da técnica de imunohistoquímica dos diferentes grupos. As reações de imunohistoquímica foram realizadas por meio da técnica da imunoperoxidase. Os cortes histológicos foram desparafinizados em estufa a 60°C por 4 horas. A desparafinização foi seguida da imersão em xilol, duas trocas a cada 10 minutos e hidratadas em álcool em concentrações decrescentes (2 banhos em álcool etílico absoluto, 90%, 70% e 50%, respectivamente) e na sequência em água destilada (10 passagens sem intervalo, RU). A recuperação antigênica foi realizada utilizando solução pH 9,0 (Target Retrieval Solution S2367, Dako Products[®], Glostrup, Dinamarca), em fervura, por 15 minutos na panela de pressão elétrica. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com imersão das lâminas em peróxido de hidrogênio 3,5% em temperatura ambiente por 10 minutos, seguido pela imersão em tampão fosfato-salino (PBS – pH 7,4). Todos os cortes foram cobertos com o anticorpo primário conforme a tabela 3, em ambiente com umidade constante a 4°C por 16 horas. Após esse período, foi realizada a detecção com o kit LSAB[®] (Dako Products[®], Glostrup, Dinamarca). O complexo antígeno anticorpo foi revelado utilizando 3,3' – diaminobenzidina (DAB) (Dako Products[®], Glostrup, Dinamarca) e os cortes foram contra corados com hematoxilina de Carazzi. As lâminas foram então lavadas em água corrente, lavadas em água amoniacal por 30 segundos, lavadas em água corrente, diafanizadas, desidratadas e montadas. As amostras foram examinadas em microscópio óptico (DM500, Leica

Microsystems[®], Wetzlar, Alemanha) adaptado a uma câmera de alta resolução (ICC50, Leica Microsystems[®], Heerbrugg, Alemanha). De cada imagem foi realizada uma sequência de fotos nos tamanhos de 5x a 1000x, sendo selecionadas foto de maior aumento, como 400x e 1000x.

TABELA 3. Relação dos anticorpos primários e secundários utilizados para técnica de imunohistoquímica dos diferentes grupos

Anticorpos primários	Fabricante	Diluição	Recuperação	Bloqueio	Anticorpo secundário	Cromógeno
Anti-ER α - mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Europe	1:200	S2367 (DAKO) pH 9	0,5% H ₂ O ₂ 10 minutos	IgG2a	DAB líquido
Anti-ER β - mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Europe	1:200	S2367 (DAKO) pH 9	0,5% H ₂ O ₂ 10 minutos	IgG2a	DAB líquido

3.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA - PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVO

Para quantificar a expressão gênica de *ESR1* e *ESR2* diferencialmente expressos entre os grupos OVX e SHAM, os espécimes (constituídos pela região odontogênica individualizada) foram mantidos em RNAlater (Life Technologies Corporation – Carlsbad[®], Canadá, EUA) e congelados a -80°C até o dia do processamento. Para tanto, foi utilizado o kit *miRvana*[™] miRNA Isolation (Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, EUA), e seguido o protocolo do fabricante, onde durante todo o procedimento de extração foi utilizada a solução RNaseZap[®] (Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, EUA) para descontaminação de todos os materiais utilizados, assim como da bancada. Este procedimento foi adotado para a obtenção de um ambiente livre de RNases que poderiam levar à degradação dos produtos de extração. Os espécimes foram descongelados e pesados de forma a garantir que a quantidade de tecido submetida à extração não estivesse fora dos limites determinados pelo kit (0,5 – 250 mg). Após pesagem, as amostras foram acondicionadas em tubos do tipo *Falcon* de 50 mL devidamente identificados e a elas foram adicionados o tampão de lise proveniente do kit Lysis/Binding Buffer for Dynabeads[™] (Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, EUA) seguindo a regra de 1mL para cada 100 mg de tecido. Os tubos foram armazenados em gelo enquanto as amostras foram homogeneizadas individualmente com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (BioSpec Products[®], Bartlesville, Alemanha).

Os espécimes então foram processados utilizando colunas filtrantes e tubos coletores fornecidos com o kit para completar o isolamento do RNA total, sendo submetidas a centrifugação e lavagem com as soluções conforme instruções do fabricante, sendo a última etapa constituída pela eluição dos ácidos nucleicos retidos na coluna utilizando 100 µL da solução de eluição - Elution Solution® (Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, EUA) aquecida a 100°C. Ao final do processo, os tubos foram armazenados em freezer a -20° C para posterior análises.

Para realização da análise de pureza e quantificação de RNA total, as amostras de RNA total foram retiradas do freezer e deixadas brevemente sobre a bancada para descongelar. A quantificação por densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop™One (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, EUA) utilizando-se 1 µL do produto da extração. A concentração de RNA foi determinada a partir de análise de absorbância a 260 nm e, com base nas leituras a 280 nm, a qualidade da amostra foi avaliada usando a razão A260/A280, com valores dessa razão próximos a 2,0 sendo considerados como indicativos de alta pureza.

Após a extração do RNA, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando 1µg de RNA total e o kit High Capacity (Applied Biosystems®, Foster City, EUA). As reações então foram submetidas ao sistema de PCR em tempo real StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, EUA) para programa de termociclagem recomendado pelo fabricante do kit de transcrição reversa utilizado. O programa consistia de uma etapa a 25° C por 10 minutos, seguido por uma etapa a 37° C por 120 minutos, outra etapa a 85° C por 5 minutos sendo então finalizado a 4° C por 5 minutos. Ao término deste processo, os espécimes estavam prontos para serem submetidas ao processo de quantificação por PCR em tempo real ou poderiam ser armazenadas em freezer a -20° C ou -80° C dependendo do tempo de armazenagem necessário.

O produto resultante do PCR (cDNA) foi utilizado para o ensaio de quantificação por PCR em tempo real (qPCR). Para tanto, realizou-se a adição do reagente TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix (2X), no AmpErase™ UNG (Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, EUA), sendo as reações para quantificação preparadas seguindo orientações do fabricante. As condições de reação de RT-PCR para cada gene de interesse foram otimizadas com relação à concentração de *primers* e eficiência da amplificação do gene

alvo. Após inserção no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, EUA), foi selecionado o programa de termociclagem “Quantitative (comparative $\Delta\Delta C_t$)”, que consiste em um estágio inicial para aquecimento das reações até 95° C por 20 segundos seguido por um estágio composto por 40 ciclos em que as amostras foram aquecidas a 95° C por 1 segundo e depois levadas a 60° C por 20 segundos para que houvesse a extensão da nova cadeia de DNA, liberação das sondas fluorescentes presentes nos ensaios e leitura desses sinais pelo aparelho, delineando a construção da curva de sinal em relação ao número de ciclos completados.

Obtidos os gráficos, foi possível determinar o valor de Cycle Threshold (C_t); visto que as amostras foram realizadas em duplicatas, primeiramente realizou-se média aritmética entre os C_{Ts} de cada amostra, e, do C_T médio obtido de cada amostra, foi subtraído o C_T médio dos diferentes controles endógenos utilizados (ACTB e GAPDH), caracterizando o primeiro Δ do método utilizado.

Na sequência, as amostras do grupo SHAM foram selecionadas como “controle” (calibradores do experimento), ou seja, essas amostras serviram como base de comparação para os níveis de expressão e caracterização dos resultados. Em outras palavras, de cada ΔC_T obtido para as amostras foi subtraído o ΔC_T médio do grupo SHAM, configurando então o $\Delta\Delta C_T$. Esse valor foi então aplicado em uma exponencial do tipo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para que fosse enfim, obtido o valor de *fold change*, isto é, a quantidade de vezes que caracteriza a diferença de expressão encontrada nas amostras.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente usando os softwares SPSS 24.0 (IBM SPSS Statistics®, New York, EUA) e GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software®, La Jolla, EUA), considerando uma significância de 5% (erro tipo I). A normalidade foi testada usando o teste de Shapiro-Wilk e análise de Quantile-Quantile plot (QQ-plot). O teste de Levene foi aplicado para testar a homogeneidade de variâncias. Os dados referentes a taxa de erupção, peso corporal, peso do útero e expressão gênica de *ERS1* e *ERS2*, seguiram uma distribuição normal e possuem homogeneidade de variâncias. Um modelo linear geral de medidas repetidas e um fator foi usado como método para Análise de Variância (ANOVA) para testar a interação entre o fator tempo

e o fator tipo de tratamento. A equivalência de matrizes de covariância foi testada pelo teste M de Box. O resultado significativo no teste de esfericidade de Mauchly demonstrou a necessidade de uma correção estatística (correção de Huynh-Feldt). O ajuste de Bonferron foi aplicado para comparações múltiplas. O teste *t de Student* foi utilizado para a comparação das médias entre os grupos OVX e SHAM.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA DE ESTRÓGENO NO PESO CORPORAL

Durante o período de experimento, foi possível observar nos dois grupos o aumento de peso corporal gradual até o dia da eutanásia (Gráfico 1). Além disso, o ganho de peso corporal demonstrou-se superior no grupo OVX quando comparado com o grupo SHAM ($p=0,002$) (Tabela 1).

GRÁFICO 1. Influência do modelo experimental (OVX e SHAM) no peso corporal em função do tempo

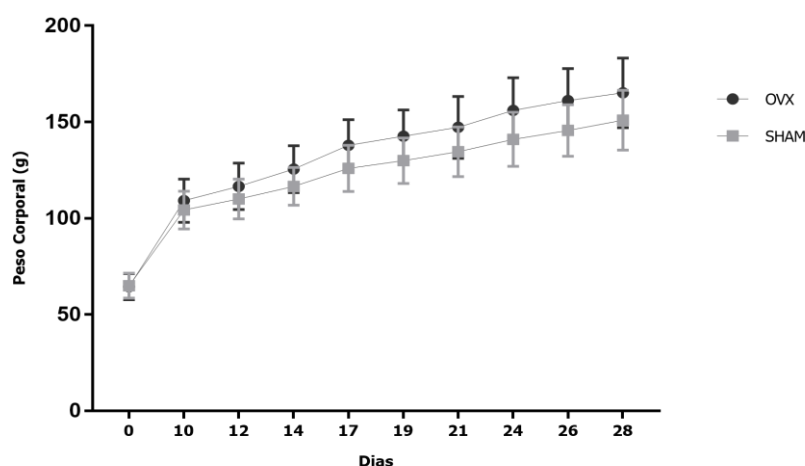


TABELA 4. Estatística descritiva e inferencial do peso corporal nos grupos OVX e SHAM

Condição do Animal	Grupos				<i>p</i> -valor
	OVX		SHAM		
	Mín.- máx.	Média (DP)	Mín.- máx.	Média (DP)	
Peso corporal	0,54 – 169,4	132,60 (12,06)	0,53 – 140,3	121,5 (10,91)	0,002

Nota: DP significa desvio padrão.

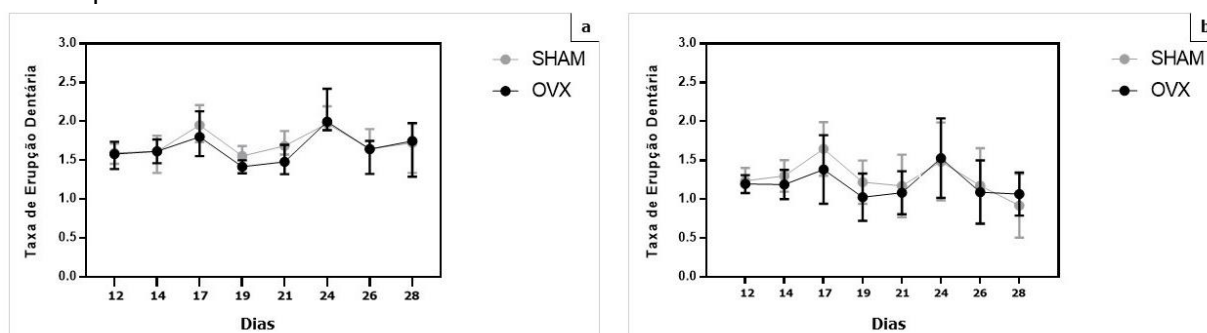
4.2 INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA DE ESTRÓGENO NA TAXA DE ERUPÇÃO DENTÁRIA

Os dados referentes a mensurações de D₂ e D₄, tanto nas condições de hipo- quanto hiperfunção, apresentaram-se com alto índice de fratura no terço incisal (59%

no grupo OVX e 53% no grupo SHAM), inviabilizando a avaliação da taxa de erupção nestes pontos referenciais.

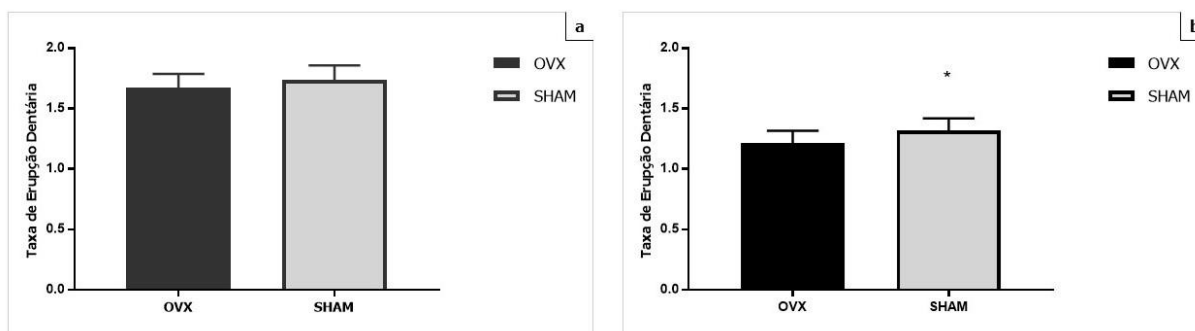
Quanto aos dados referentes a mensurações de D_1 e D_3 , nota-se que no grupo OVX em condições de hipofunção (D_1) há uma ligeira diminuição da taxa de erupção dentária em relação ao grupo SHAM entre os dias 17 e 21 (Gráfico 2a). Em condição de hiperfunção (D_3), é possível observar que a taxa de erupção dentária no grupo OVX demonstra uma ligeira redução entre os dias 14 e 19 quando comparada com o grupo SHAM (Gráfico 2b).

GRÁFICO 2. Influência do modelo experimental (OVX e SHAM) na taxa de erupção dentária em função do tempo



Legenda: a. Dentes em condição de hipofunção. b. Dentes em condição de hiperfunção

Quando as médias finais da taxa de erupção são comparadas, em condição de hipofunção (D_1), não há diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,09$) (Gráfico 3a). Por outro lado, quando se compara os grupos em condição de hiperfunção (D_3), o grupo OVX demonstrou taxa de erupção diminuída em relação ao grupo SHAM, ($p= 0,03$) (Gráfico 3b).

GRÁFICO 3. Influência do modelo experimental (OVX e SHAM) na taxa de erupção dentária

Legenda: a. Dentes em condição de hipofunção. b. Dentes em condição de hiperfunção.

A interação entre os fatores tempo experimental e grupo teste foi testada por meio da ANOVA (Análise de Variância) (Tabela 2). Os resultados demonstraram que há um efeito significativo do tempo nas medidas de taxa de erupção. Entretanto, quando o fator grupo experimental é incluído na inferência, observa-se que não há uma interação entre os valores de matrizes da taxa de erupção.

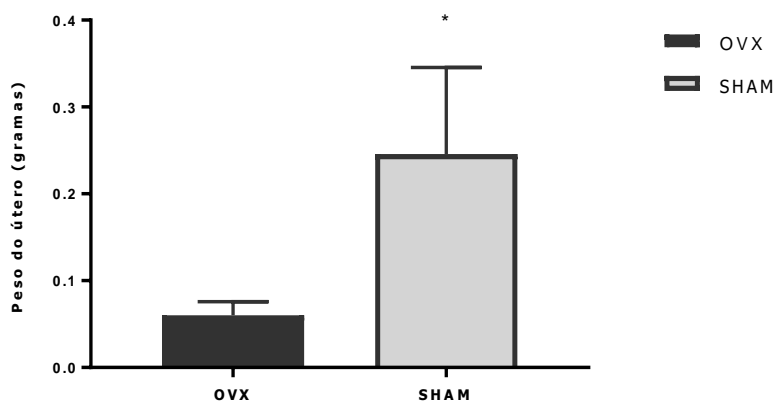
TABELA 5. Interação entre o fator grupo experimental (OVX e SHAM) e a variável tempo: Análise de variância para um fator e medidas repetidas.

		p-value	η^2
Efeitos Principais	Tempo	0,000 (1.00)	0,262
	Grupo Experimental	0,004 (0.85)	0,209
Interações	Tempo x Grupo Experimental	0,459 (0.33)	0,025
Box' M: p-valor		0,547	

4.3 INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA DE ESTRÓGENO NA ATROFIA UTERINA

Após eutanásia, foi possível observar que o grupo OVX apresentou significativa atrofia uterina quando comparado ao grupo SHAM ($p \leq 0,0001$) (Gráfico 4).

GRÁFICO 4. Influência do modelo experimental (OVX e SHAM) no peso do útero (em gramas)



4.4 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DA REGIÃO ODONTOGÊNICA

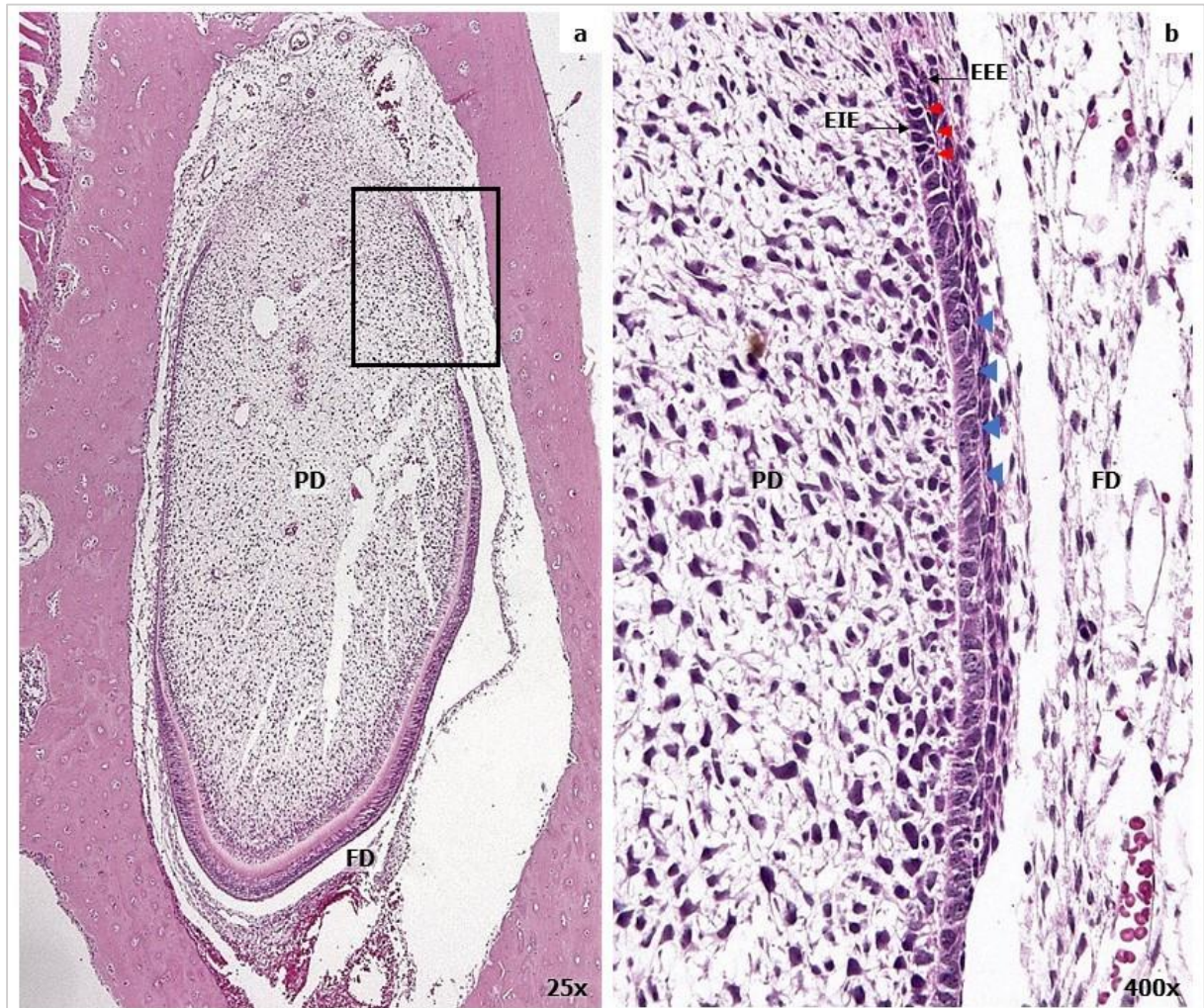
4.4.1 HISTOLOGIA DA REGIÃO ODONTOGÊNICA

Em um corte transversal da região odontogênica do incisivo inferior, em sua porção média, é possível observar o estágio de campânula da odontogênese. Este estágio é marcado pela histodiferenciação de um conjunto de células epiteliais semelhantes em componentes distintos morfo- e funcionalmente (Figura 10).

Em um corte longitudinal da região odontogênica, é possível observar a diferenciação de ameloblastos (a partir do epitélio interno) e odontoblastos (a partir das células da papila dentária adjacentes ao epitélio interno). Esta diferenciação inicia-se na ponta de cúspides e/ou bordas incisais e progride em direção a alça cervical (Figura 11).

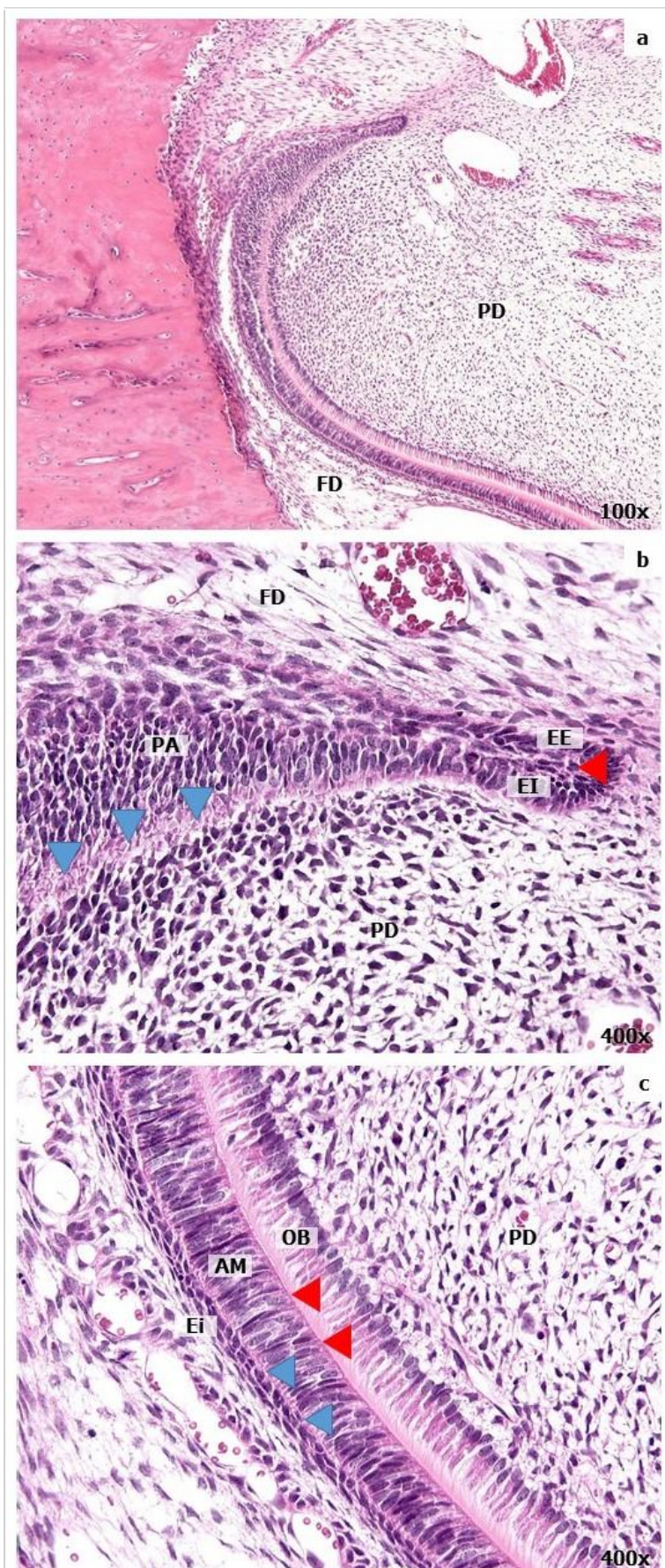
Em cortes subsequentes, é possível observar a conformação da porção final da região odontogênica. Nota-se deposição completa de esmalte e dentina, assim como a formação de cimento. Em dentes com erupção contínua, esse estágio corresponde ao estágio de formação radicular (Figura 12).

FIGURA 10. Fotomicrografia da porção média da região odontogênica do incisivo inferior de roedores após tratamento com coloração de hematoxilina e eosina – corte transversal



Legenda: a. Porção média da região odontogênica do incisivo inferior correspondente ao estágio de campânula da odontogênese. A região em destaque é chamada de alça cervical. b. Em uma visão ampliada da alça cervical, pode-se observar os epitélios, externo e interno do órgão dentário (EE e EI, respectivamente). O EE e o EI do órgão dentário se unem e circundam o retículo estrelado (setas em vermelho). O EE assume característica cuboide. O EI adquire forma cilíndrica baixa, caracterizado pelo alto conteúdo de glicogênio. A papila dentária (PD) e folículo dentário (FD) também são evidentes. As células da papila dentária apresentam-se como células mesenquimais indiferenciadas. Ao longo da alça cervical é possível observar a redução do retículo estrelado (setas em azul), que darão início à formação de esmalte dentário.

FIGURA 11. Fotomicrografia da região odontogênica do incisivo inferior de roedores após tratamento com coloração de hematoxilina e eosina – corte longitudinal



Legenda: a. Histodiferenciação ao longo da alça cervical. b. Em uma visão mais ampliada da alça cervical, pode-se observar a união dos epitélios, interno e externo (EI e EE, respectivamente), retículo estrelado (seta em vermelho) e papila dentária (PD). Entre o EI e RE forma-se o estrato intermediário que participará da formação do esmalte de dentário. As células do EI, até então, cilíndricas e baixas, tornam-se altas com inversão de polaridade. Estas células transformam-se em pré-ameloblastos (PA). Sob influência dos PAs, as células mesenquimais da periferia da PD interrompem sua divisão e logo se diferenciarão em odontoblastos (setas em azul).

c. Observa-se que os pré-odontoblastos diferenciaram-se em odontoblastos (OB). Após a deposição de dentina (dentina do manto) (setas em vermelho), os pré-ameloblastos completarão sua diferenciação em ameloblastos (AM) e há formação inicial de esmalte (setas em azul). Pode-se observar duas ou três camadas de células pavimentosas que constituem o estrato intermediário (Ei), que participará da formação do esmalte.

FIGURA 12. Fotomicrografia da porção final da região odontogênica do incisivo inferior de roedores após tratamento com coloração de hematoxilina e eosina – corte transversal



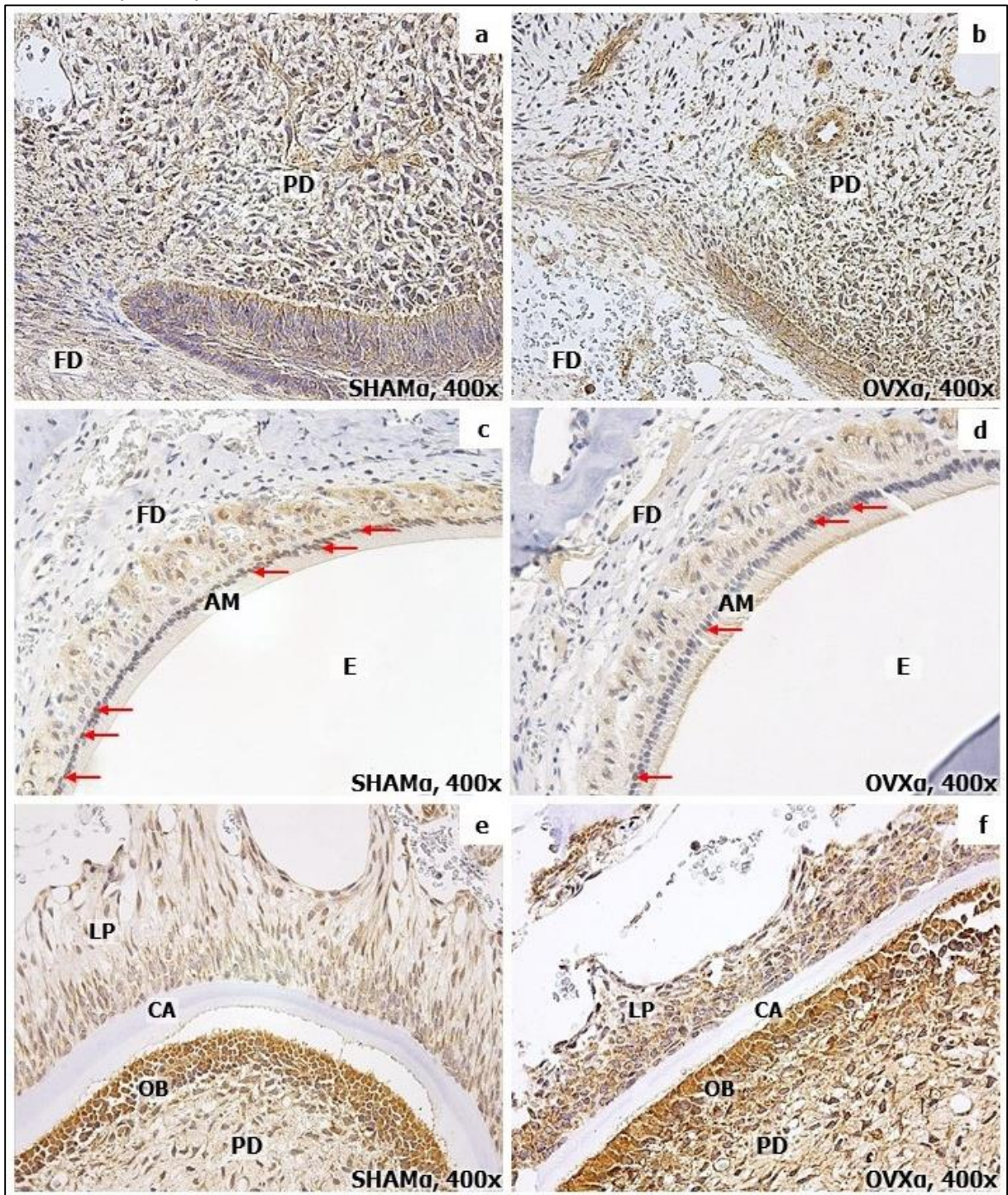
Legenda: a. Porção final da região odontogênica do incisivo inferior correspondente ao estágio de formação radicular. As regiões em destaque estão ampliadas na figura 13b (face lingual do incisivo inferior) e figura 13c (face mesio-vestibular do incisivo inferior). Em b, nota-se a presença de ligamento periodontal (LP), cemento acelular (CA), odontoblastos (OB) e papila dentária (PD). O LP ancora os incisivos ao osso circundante na face lingual. As setas em vermelho indicam as fibras de Sharpey. Em c, nota-se a presença de pré-dentina (PD), dentina (D), esmalte (E), ameloblastos (AM) e estrato intermediário (Ei) envolvido pelo folículo dentário (FD).

4.4.2 INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA DE ESTRÓGENO NA IMUNOEXPRESSION DOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO (ER α e ER β) NA REGIÃO ODONTOGÊNICA

O ER α pode ser descritos com imunoexpressão nuclear. Em um corte longitudinal da região odontogênica, nota-se que a região de alça cervical não apresentou imunoexpressão em ambos os grupos (OVX e SHAM) (Figura 13a e b). Já a região de ameloblastos, de ambos os grupos (OVX e SHAM), demonstrou imunoexpressão de ER α (Figura 13c e d). A região constituída pelos tecidos de sustentação também não demonstrou imunoexpressão nuclear de ER α em ambos os grupos (OVX e SHAM) (Figura 13e e f).

O ER β pode ser descritos com imunoexpressão nuclear e citoplasmática. Em um corte longitudinal da região odontogênica, nota-se imunoexpressão em células da papila dentária no grupo OVX (Figura 14a e b). A região contendo os ameloblastos não demonstrou imunoexpressão para o ER β em nenhum dos grupos (OVX e SHAM) (Figura 14c e d). A região constituída pelos tecidos de sustentação, a imunoexpressão de ER β demonstrou-se presente em cementoblastos de ambos os grupos (OVX e SHAM) e ligamento periodontal no grupo OVX (Figura 14e e f).

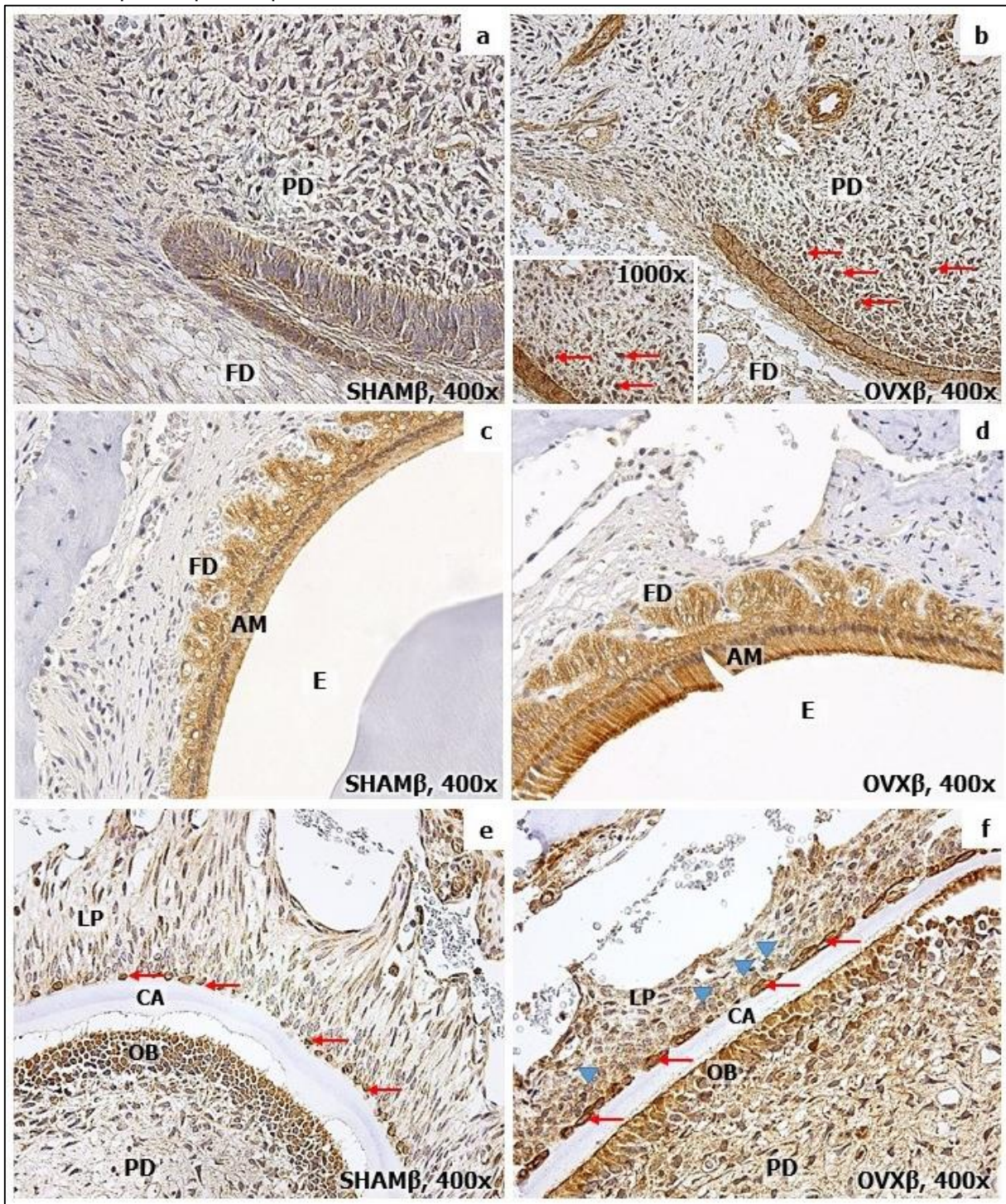
FIGURA 13. Fotomicrografia da porção referente a alça cervical da região odontogênica (a e b); região de ameloblastos (c e d) e região dos tecidos de sustentação (e e f) após a realização da técnica de imunohistoquímica para ER α



Legenda: As figuras a e b, correspondentes a região de alça cervical do incisivo inferior, não demonstraram presença de imunoposição para ER α . Já nas figuras c e d, há imunoposição para ER α em ambos os grupos, indicados pelas setas em vermelho. Nas figuras e e f, correspondente aos tecidos de suporte, também não houve imunoposição de ER α .

Papila dentária (PD), fóliculo dentário (FD), ameloblastos (AM), esmalte (E), ligamento periodontal (LP), cemento acelular (CA), odontoblastos (OB).

FIGURA 14. Fotomicrografia da porção referente a alça cervical da região odontogênica (a e b); região de ameloblastos (c e d) e região dos tecidos de sustentação (e e f) após a realização da técnica de imunohistoquímica para ER β

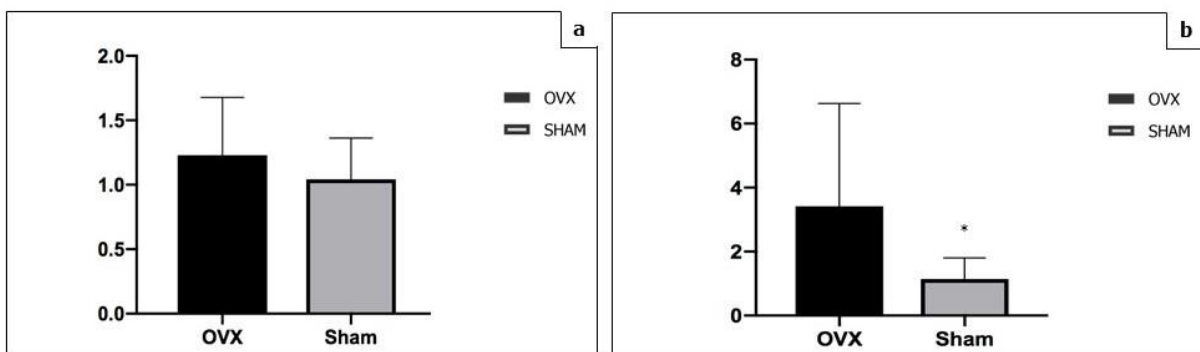


Legenda: As figuras a e b, correspondentes a região da alça cervical do incisivo inferior. Em a, não houve presença de imunoexpressão para ER β no grupo SHAM. Já em b, as células da papila dentária demonstram imunoexpressão de ER β (setas em vermelho). Nas figuras c e d, não houve imunoexpressão para ER β em ambos os grupos. Já nas figuras e e f, correspondente aos tecidos de suporte, houve imunoexpressão de ER β em ambos os grupos. As setas em vermelho indicam a imunoexpressão em cementoblastos. As setas em azul indicam a imunoexpressão em ligamento periodontal. Papila dentária (PD), folículo dentário (FD), ameloblastos (AM), esmalte (E), ligamento periodontal (LP), cemento acelular (CA), odontoblastos (OB).

4.5 INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA DE ESTRÓGENO NA EXPRESSÃO GÊNICA DE *ESR1* E *ESR2* NA REGIÃO ODONTOGÊNICA

Pode-se observar que a expressão gênica *ESR1* de estrógeno não diferiu na comparação entre os grupos OVX e SHAM ($p=0.33$) (Gráfico 5a). Entretanto, a expressão gênica *ESR2* foi significativamente menor no grupo SHAM ($p=0.05$) (Gráfico 5b).

GRÁFICO 5. Influência do modelo experimental (OVX e SHAM) na expressão relativa de RNAm (*ESR1* e *ESR2*) na região odontogênica



Legenda: a. Expressão gênica de *ESR1* na região odontogênica. b. Expressão gênica de *ESR2* na região odontogênica

Discussão

5 DISCUSSÃO

5.1 DESENHO DO ESTUDO E TAMANHO AMOSTRAL

A erupção dentária tipicamente associada ao desenvolvimento craniofacial, embora de demasiada importância para o aparelho estomatognático, ainda não está completamente compreendida. De forma pragmática, a compreensão dos mecanismos envolvidos nesse fenômeno tem grande relevância clínica quando se considera que há uma influência multifatorial tanto no processo de erupção dentária (Almonaitiene et al., 2010; Chandna et al., 2011; Chen et al., 2016; Verma et al., 2017; Vucci et al., 2017; Jain e Rathee, 2019; Tokavanich et al., 2019), quanto nos vários mecanismos que a deficiência de estrógeno pode desempenhar (Kabir et al., 2015; Liu et al., 2015; Cui et al., 2016; Almeida et al., 2017; Chin, 2018; Christ et al., 2018; Sukocheva et al., 2018; Ahiko et al., 2019). Portanto, mediante situações fisiológicas ou patológicas atribuídas ao corpo humano, pode-se ter uma resposta na região odontogênica que consequentemente poderão ocasionar desvios significativos no curso da erupção dentária.

Nessa pesquisa, o modelo experimental murino foi adotado devido a erupção contínua de incisivos superiores e inferiores, a similaridade com a região odontogênica humana e aplicabilidade de um modelo *in vivo* de deficiência de estrógeno (Thompson et al., 1995; Weitzmann e Pacific, 2006; Merzel e Novaes, 2006). A erupção contínua dos incisivos possui capacidade regenerativa, sendo considerado o melhor modelo para replicações de fenômenos associados a taxa de erupção dentária. Além disso, a porção inicial da região odontogênica, apresenta similaridade com os estágios de capuz e campânula da odontogênese humana (Thompson et al., 1995; Merzel e Novaes, 2006). Deste modo, é possível identificar alterações na erupção dentária durante toda vida do animal. É válido ressaltar que o fenômeno de erupção contínua ocorre apenas em incisivos, diferentemente dos outros dentes da arcada dentária que seguem curso normal (Treuting, Dintzis, Montine, 2018).

O modelo de roedores destinados a esta pesquisa foi realizado com ratas heterogêneas da linhagem Wistar Hannover. Essa linhagem foi selecionada pois permite uma maior reprodutibilidade do desenvolvimento humano em razão de mais de 90% de seu genoma poder ser dividido em regiões correspondentes ao dos

humanos (Waterston et al., 2002). Desta forma, foi possível demonstrar resultados próximos ao desenvolvimento humano, tanto em níveis sistêmicos e quanto comportamentais. Corroborando com a escolha dos animais heterogêneos, diversos estudos relacionados a taxa de erupção dentária, também denotam essa particularidade (Shimada et al., 2005; Drevensek et al., 2009; Gomes et al., 2013; Araújo et al., 2014; Silva et al., 2016).

Existem diversos modelos para desencadear a deficiência de estrógeno, dentre os mais utilizados podemos citar o uso de animais geneticamente modificados (Polur et al., 2015; Hewitt et al., 2016), o uso de antagonistas de ERs (Márquez-Hernández et al., 2011b; Steffens et al., 2018) e a cirurgia de ovariectomia (Lorimier, 1972; Macari et al., 2015). Os animais geneticamente modificados, apesar de serem muito utilizados para investigação experimental de ações relacionadas a erradicação do estrógeno, não explicariam a influência da deficiência de estrógeno e seus receptores, uma vez que (Davey et al., 2004; McCauley, Tözüm, Rosol, 2002) estes animais apresentariam fenótipos mais graves da deficiência/ausência de estrógeno nos tecidos. Já o uso de antagonistas de ERs poderiam remeter processos farmacocinéticos e farmacodinâmicos ocasionando vieses quando na análise dos resultados (Ferreira et al., 2011; Kabir et al., 2015; Kiyama e Wada-Kiyama, 2015; Almeida et al., 2017; Dabre et al., 2017). Portanto, no presente trabalho, a deficiência de estrógeno foi realizada experimentalmente pela cirurgia de ovariectomia (Weitzmann e Pacifici, 2006). O modelo se destacar pois a deficiência hormonal em ratas assemelha-se aos padrões de alterações apreciados em humanos sob essa mesma condição (Blanchard et al., 1991; Frost e Jee, 1992; Gevers et al., 1995; Thompson et al., 1995; van der Eerden et al., 2002a). A ovariectomia provoca a deficiência semelhante à menopausa, estimulando a reabsorção óssea por meio de células osteoclásticas (Weitzman e Pacifici, 2006) e do aumento de vida útil dessas células (Thompson et al., 1995; Krum et al., 2008; Martin-Millan et al., 2010), induzindo a osteopenia.

Em relação ao período escolhido para o procedimento de ovariectomia, optou-se por iniciar a experimentação aos 25 dias de vida pós-uterina, correspondente ao período pré-puberal de ratas Wistar Hannover (Ojeda et al., 1976; Treuting, Dintziz, Montine, 2018). Essa estratégia objetivou a mimetização dos níveis de estrógenos circulantes no corpo do animal antes de sua maior descarga hormonal e consequente

maturação sexual. Seguiu-se a proposição que a taxa de erupção dentária poderia estar alterada quando houvesse grandes descargas hormonais, como nos resultados de estudos prévios realizados no modelo humano (Filipsson, Lindsten, Almqvist, 1965; Roberts et al., 1986; Midtbo e Halse, 1992; Hass et al., 2001; Ahiko et al., 2019).

Para acompanhar da redução dos níveis séricos de estrógeno durante o período experimental, o aumento do peso corporal foi registrado. Nossos resultados demonstraram um ganho de peso corporal gradualmente maior no grupo OVX quando comparado ao grupo SHAM. Fundamentam esse resultado, estudos prévios que também acompanharam o animal por um período maior de tempo e demonstraram diferença significativa no peso corporal (Ochi et al., 2014; Wayama et al., 2015; Cui et al., 2016; Darbre et al., 2017). Os animais ovariectomizados desenvolvem hiperfagia e diminuição de gasto de energia, o que resulta em obesidade e resistência à insulina (Rogers et al., 2009; Zhu et al., 2013; Darbre et al., 2017). No entanto, enfatiza-se que o controle do peso corporal não é suficiente para validar a deficiência de estrógeno. Então, logo após a eutanásia, foi realizado uma autópsia para comprovar a atrofia uterina (Ochi et al., 2014; Wayama et al., 2015; Cui et al., 2016; Romualdo et al., 2018).

Em alguns artigos relacionados a eficiência da cirurgia de ovariectomia, as concentrações plasmáticas de estrógeno também foram avaliadas. No entanto, existe uma variação hormonal constante em cada ciclo reprodutivo do animal, assim seria difícil estabelecer um parâmetro a ser seguido (Treuting, Dintziz, Montine, 2018). A efetividade da ovariectomia também pode ser realizada pela diminuição da densidade mineral (BMD), utilizando microtomografia computadorizada (microCT). Neste trabalho a complementação por essa metodologia foi excluída uma vez que o efeito da deficiência de estrógeno avaliada por meio da MicroCT depende do tipo de osso avaliado. Em ossos longos as alterações da microarquitetura trabecular foram observadas após 12 semanas do procedimento cirúrgico (Liu et al., 2015; Hao et al., 2016). Em contrapartida no osso subcondral da articulação temporomandibular foi possível observar alterações após 10 semanas do procedimento (Chen et al., 2014). Deste modo, embora os efeitos da diminuição dos níveis endógenos de estrógeno possam afetar a microarquitetura e a densidade mineral dos ossos maxilares e mandibulares, os resultados ainda são inconsistentes.

A avaliação da taxa de erupção dentária foi realizada por meio do registro de imagem pelo estereomicroscópio óptico associado a câmera acoplada ao dispositivo e posterior análise por software. A literatura descreve vários métodos para avaliação quantitativa da taxa de erupção dentária. Alguns autores utilizam metodologia mais simples como análise direta com paquímetro (Lorimier 1972), análise direta com microscópio óptico e paquímetro digital (Gerlach et al., 2000; Sasaki et al., 2003; Omar et al., 2018) e registro de imagem com microscópio óptico e câmera acoplada ao dispositivo (Lee et al., 2002). Outros autores, utilizam tecnologia mais sofisticada, como os dispositivos eletrônicos conectados a um voltímetro digital. No entanto, esses equipamentos possuem alto custo e necessitam de procedimentos cirúrgicos para serem instalados (Shimada et al., 2006). Em um estudo comparativo de métodos de avaliação de taxa de erupção sob condição de visão direta e registro de imagem, foi possível demonstrar que não houve diferença significativa entre as metodologias utilizadas. Contudo, as aferições por método direto podem ser influenciadas pela memória do operador, diminuindo a confiabilidade de resultados (Lee et al. 2002).

Os incisivos inferiores foram selecionados devido a capacidade de erupção mais acelerada quando comparados aos incisivos superiores (Matěna, 1972; Treuting, Dintziz, Montine, 2018). Além disso, houve uma melhor relação de paralelismo da coroa clínica em relação a lente do estereomicroscópio (Treuting, Dintziz, Montine, 2018). Posteriormente, procedeu-se a padronização e ajuste incisal, criando as condições de hipo- e hiperfunção (Gerlach et al., 2000; Gerlach et al., 2002; Lee et al., 2002; Gomes et al., 2013; Omar et al., 2018). Diversos autores, relatam que o encurtamento ou ajuste do bordo incisal do incisivo, pode remeter um aumento acentuado na taxa de erupção e replicar alterações sistêmicas mínimas associadas a taxa de erupção dentária (Bryer 1957; Gerlach et al., 2000; Lee et al., 2002). Contudo, cabe ressaltar que não foram encontrados resultados significativos nos dentes em condição de hipofunção. Isso pode ser justificado pelas alterações da região odontogênica na deficiência de estrógeno que serão discutidas posteriormente, ou pela incompatibilidade de metodologia empregada. Segundo alguns autores, a delimitação do ponto P no incisivo em condição de hipofunção pode inviabilizar resultados, tendo em vista que a gengiva pode torna-se hiperplásica e friável quando o incisivo é encurtado regularmente. Isso faz com que haja deslocamento do parâmetro principal

(Aladdin e Burn-Murdoch, 1985b; Gerlach et al., 2000; Lee et al., 2002), podendo propagar resultados falsos-positivos.

5.2 REGIÃO ODONTOGÊNICA DE DENTES COM CRESCIMENTO CONTÍNUO – INCISIVOS INFERIORES DO MODELO MURINO

A região odontogênica de dentes com erupção contínua apresenta um grau elevado de metabolismo, proliferação e diferenciação (Wise et al., 2002; Oshima et al., 2005; Wise, 2009; Zhou et al., 2019). Esses dentes que se desenvolvem continuamente durante toda a vida do animal, dependem das células-tronco epiteliais e mesenquimais para manter a sua capacidade regenerativa (Treuting, Dnitzis, Montine, 2018). Sendo assim, sugere-se que o grau de responsividade da região odontogênica frente a agentes internos e/ou externos esteja diretamente relacionado a taxa de erupção dentária contínua. Diante disso, propôs-se a identificação das estruturas que compõem a região odontogênica e a análise de receptores que corroborassem ativamente com a deficiência de estrógeno. Em termos práticos, esse a identificação de estruturas no modelo animal pode fornecer informações valiosas ao estudo dos mecanismos associados a erupção e desenvolvimento dentário.

Os dentes com erupção contínua nos permitem correlacioná-los com a odontogênese em humanos (Merzel e Novaes, 2006; Treuting, Dnitzis, Montine, 2018). Esses dentes retratam estágios iniciais da odontogênese, mais especificamente, estágios de capuz e campânula, independentemente da idade do animal (Treuting, Dnitzis, Montine, 2018). Além disso, o modelo murino nos permite também aproximar os estágios posteriores da odontogênese, como a formação radicular. Os dentes com erupção contínua são cobertos por esmalte somente na face vestibular. A face lingual é coberta por cimento e ligamento periodontal (Treuting, Dnitzis, Montine, 2018). Assim, em um corte transversal da porção final da região odontogênica por exemplo, todas as estruturas que compõem a odontogênese se fazem presentes (Matěna, 1972). Em nosso trabalho, propôs-se realizar cortes histológicos em diversos seguimentos da região odontogênica com objetivo de identificar tecidos e posteriormente, simplificar a análise imunohistoquímica dos ERs. Além disso, a região odontogênica também foi isolada para análise da expressão gênica de *ESR1* e *ESR2*,

realizada por meio da técnica de PCR em tempo real quantitativo, com o intuito de sugerir as reais possibilidades de atuação desse hormônio.

Os cortes foram realizados ao longo da região odontogênica e em sentido transversal. Foram utilizadas as porções, média e final, da região odontogênica. A região inicial corresponde ao estágio de capuz, onde o evento mais evidente é a proliferação celular, que proporciona o aumento do número de células tato do epitélio (que está invaginando) quanto do ectomesênquima (que se condensa abaixo do epitélio). A partir da porção média, que corresponde a fase de campânula, inicia-se a morfogênese e a histodiferenciação. Assim, um conjunto de células epiteliais semelhantes torna-se um componente distinto morfo- e funcionalmente (Nanci, 2014). A morfogênese e a histodiferenciação iniciam a formação do retículo estrelado, epitélio dentário externo e interno e, estrato intermediário. A união dos epitélios dentários, externo e interno dão origem a alça cervical. Diversos autores relatam que a alça cervical localizada no "ápice radicular" contém células-tronco e/ou progenitoras (Nanci, 2014). As células mesenquimais indiferenciadas da papila aumentam rapidamente de tamanho e basicamente, diferenciam-se em odontoblastos. Conforme a evolução da dentinogênese, as células do epitélio dentário interno concluem a diferenciação, assumem função secretora e produzem matriz orgânica em contato com a superfície de dentina recém-formada e, quase instantaneamente, a matriz orgânica é mineralizada formando o esmalte (Nanci, 2014).

A fase seguinte, formação radicular, também é proveniente da proliferação dos epitélios, interno e externo, da alça cervical. A partir desse estágio, a erupção dentária é iniciada no sentido axial em humanos (Nanci, 2014). A alça cervical sofrerá uma diferenciação em diafragma epitelial e a bainha epitelial de Hertwig, quase imperceptível no modelo murino (Treuting, Dnitzis, Montine, 2018). O diafragma epitelial corresponde a porção final do encontro entre epitélio interno e externo; já a bainha epitelial de Hertwig é uma estrutura mais complexa e que será responsável por guiar o desenvolvimento dos tecidos de sustentação: cimento, ligamento periodontal e osso alveolar (Nanci, 2014). Todas as estruturas supracitadas foram recapituladas perante a interação nas teorias da erupção dentária (Jain e Rathee, 2019). Assim, sugere-se os receptores de estrógeno possam estar localizados nessas estruturas, e possam colaborar com desvios significativos na taxa de erupção dentária.

5.3 TAXA DE ERUPÇÃO DENTÁRIA E A DEFICIÊNCIA DE ESTRÓGENO

Ao final de três semanas, a média das diferenças entre os grupos OVX e SHAM foram comparadas. Em condição de hipofunção não foram obtidos resultados estatisticamente significativos entre os grupos. No entanto, quando analisado os dados referentes as condições de hiperfunção, o grupo OVX demonstrou uma taxa de erupção dentária diminuída em relação ao grupo SHAM.

Atualmente, é sabido que a influência multifatorial prejudica a compreensão e discussão dos diversos fatores envolvidos no processo de erupção dentária. A título de exemplo, podemos destacar os resultados obtidos nesta pesquisa nos dentes submetidos a condição hipofunção. Há um respaldo abundante na literatura quanto a erupção dentária acelerada em dentes em condição de hipofunção, de acordo com o estágio de odontogênese em que se encontre (Almonaitiene et al., 2010; Verma et al., 2017; Jain e Rathee, 2019). Isto é, independente de estudos em humanos ou animais, caso haja perda do dente, ocasionado uma condição de hipofunção, depois que o sucessor já tenha iniciado o processo, haverá uma aceleração. Se essa perda ocorrer antes que o sucessor entre na fase pré-eruptiva haverá um atraso. Ademais, o processo de erupção dentária em condição de hipofunção foi descrito com uma velocidade de duas a três vezes maior que dentes em condição de hiperfunção (Bryer 1957; Gerlach et al., 2000; Lee et al., 2002). Porém, quando os incisivos são submetidos a uma condição de hipofunção, juntamente com a deficiência de estrógeno, supõem-se que haja uma diminuição da proliferação celular, que poderá ocasionar desvios significativos na taxa de erupção, pela formação de estruturas deficientes relacionadas ao processo (Gomes et al., 2013).

A deficiência de estrógeno pode ser descrita e associada com a densidade mineral óssea e estrutura de ligamento periodontal (Liu et al., 2015; E, 2016; Lu et al., 2016; Wang, McCauley 2016; Alhodhodi et al., 2017; Ahiko et al., 2019). A porosidade significativa causada pela alta atividade de osteoclastos ao longo do eixo do dente resulta em uma estrutura óssea friável, bem como, desorganização das fibras colágenas do ligamento periodontal (Zhang et al., 2011; Liu et al., 2015; Manokawinchoke et al., 2016). Assim, com as estruturas do tecido de sustentação prejudicadas, o metabolismo e a remodelação durante a erupção dentária, principalmente em dentes com erupção contínua, também podem apresentar-se

prejudicados. Deste modo, é possível sugerir que a modificação nas estruturas dos tecidos de sustentação poderia não exercer uma força de tração suficiente para que o dente seja capaz de movimentar-se.

A fragilidade morfológica das fibras periodontais submetidas a deficiência de estrógeno também pôde ser demonstrada em estudo realizado em modelo murino, no qual a carga mecânica funcional foi reduzida pela extração do dente antagônico. Como resultados, os autores puderam observar uma perda óssea no volume do osso alveolar. No entanto, a aposição óssea continuou na superfície do osso alveolar voltada para o ligamento periodontal, resultando em aumento da altura vertical do osso sem sustentação pelas fibras periodontais. A aposição óssea em condições rudimentares, ocasionou uma leve extrusão dentária, porém, a movimentação da erupção dentária continuou sem alterações significativas (Ejiri et al., 2008). Indivíduos portadores da Síndrome de Turner também demonstraram um resultado interessante quanto a morfologia coronária e radicular de alguns dentes. Além da morfologia simplificada presente nesses indivíduos, foi possível observar também defeitos na qualidade de esmalte (Nakayama et al., 2018; Ahiko et al., 2019; Maier et al., 2019). Em nosso estudo, as medidas referentes aos bordos incisais foram excluídas devido ao índice de fratura. Assim, sugere-se que os defeitos na qualidade de esmalte, além da conformação radicular, poderiam ter favorecido ainda mais o índice de fratura e conseqüentemente, desvios significativos na taxa de erupção dentária.

Em relação aos resultados obtidos nos dentes submetidos a condição de hiperfunção, sugere-se que a diminuição da taxa de erupção dentária possa estar associada à deficiência na remodelação dos tecidos de suporte, associada ao esforço mastigatório provocado pela condição de hiperfunção. Corroborando com nossos resultados, o estudo de Lorimier (1972), realizado em dentes em condição de normofunção, também observou uma diminuição da taxa de erupção dentária. Novamente, a influência multifatorial pode justificar nossos resultados referentes a condição de hiperfunção, uma vez que, os esforços mastigatórios ou qualquer resistência oclusal, também pode causar alteração do curso normal da erupção dentária (Moxham e Berkovitz, 1995; Almonaitiene et al., 2010; Ames et al., 2010).

Durante as semanas de experimentação, salienta-se que houve uma discrepância de resultados entre os dias 14 e 19, correspondente ao final da primeira

e início da segunda semana de vida pós-uterina. Sugere-se que o decorrer desse período, estaria presente, o ápice do período puberal em animais que se encontram entre a puberdade e a plena maturidade (Treuting, Dintzis, Montine, 2018). Isto é, pode-se dizer que essa discrepância ocorreu em um período que aconteceria maior liberação endógena de estrógeno. É importante relatar essa temática pois os estudos realizados em humanos com diagnósticos de deficiência de estrógeno destacaram achados clínicos referentes ao retardo de erupção dentária exatamente quando os indivíduos atravessavam o período que seria de maior liberação de estrógeno (Roberts et al. 1986; Mitbo e Halse, 1992; Ahiko et al., 2019).

No estudo de Roberts et al. (1986) exalta-se ainda mais a hipótese de um efeito bifásico do estrógeno na dentição em desenvolvimento no qual, a deficiência de estrógeno poderia estar acelerando o desenvolvimento em período pré-puberal. Isso explicaria a erupção adiantada em meninas comparados aos meninos. Todavia, o estudo também descreve o retardo do desenvolvimento em níveis elevados ou deficientes associados ao período puberal. Contudo, é válido ressaltar que no estudo de Roberts et al. (1986), a avaliação do desenvolvimento odontogênico foi realizada em pacientes com puberdade precoce devido a lesões associadas ao sistema nervoso central, incluindo hamatomas, hidrocefalia congênita, astrocitoma, neurofibrose, cistos aracnoides, síndromes dentre outras patologias. Diversas dessas alterações já foram descritas como coadjuvante no desvio da taxa de erupção dentária (de Moraes Gallarreta et al., 2010; Scaramucci et al., 2011; Canger et al., 2013). Assim, fica inviabilizado a comparação direta com estes resultados.

Um estudo realizado em meninas com Síndrome de Turner, relatou que a deficiência de estrógeno poderia causar um avanço do desenvolvimento e erupção dentária moderadamente avançada ou normal. É importante enfatizar que o estudo foi realizado em uma amostra muito heterogênea. Foram incluídas meninas com idades entre 7-16 anos, ou seja, todos períodos críticos da fase de maturação sexual (Mitbo e Halse, 1972). Além disso, o estudo avaliou o desenvolvimento e erupção dentária por meio do método de Demirjian et al. (1973). Esse tipo de avaliação compreende na análise dos estágios de desenvolvimento dentário e possui como grande desvantagem, o risco de vieses quando aplicados em indivíduos mais velhos. Isto é, com o aumento da idade, o número de dentes em desenvolvimento diminui e a classificação é baseada

principalmente na formação de raízes, que é um processo de poucos "eventos" e longa duração. Contudo, a sugestão que os resultados de Mitbo e Halse (1992) podem corroborar com este trabalho se baseiam nos resultados expressos isoladamente. As meninas em fase pré-puberal, média de 8 anos de idade, apresentaram erupção acelerada. Em contrapartida, as meninas em idade puberal, média de 12 anos de idade, demonstraram um retardo na erupção dentária quando comparadas às meninas controle.

Outro ponto a ser discutido sobre estudos clínicos da taxa de erupção dentária em modelo humano, é a deficiência da padronização da nomenclatura (Mitbo e Halse, 1992). Embora alguns autores entendam que o desenvolvimento odontogênico e erupção dentária são processos essencialmente diferentes, e que podem ser influenciados por fatores genéticos, ambientais e hormonais, a grande maioria dos estudos relacionados a deficiência de estrógeno e a erupção dentária em modelos humanos, tratam termos como desenvolvimento odontogênico, formação dentária, maturação dentária e erupção dentária como análogos (Mitbo e Halse, 1972; Roberts et al., 1986). Essa heterogeneidade de termos contribui para formação de vieses e dificulta a interpretação dos resultados.

5.4 IMUNOEXPRESSÃO E EXPRESSÃO GÊNICA NA REGIÃO ODONTOGÊNICA NA DEFICIÊNCIA DE ESTRÓGENO

Os diferentes clones dos ERs têm apresentado padrões de imunexpressão não homogêneos, onde apresentam tanto marcação predominantemente nuclear (Nilsson et al., 1999) como também nuclear e citoplasmática (van der Eerden et al., 2002b). Essas proteínas têm ações no núcleo celular, regulando a transcrição de genes-alvo específicos, ligando-se a sequências reguladoras de DNA associadas (Green et al., 1986; Barros et al., 2011; Levin et al., 2015; Eyster, 2016; Hamilton et al., 2017).

Nossos resultados demonstram que a região odontogênica possui expressões de ambos os receptores: ER α e ER β . No entanto, a imunexpressão de ER α foi observada principalmente em ameloblastos em ambos os grupos, OVX e SHAM. Esse resultado corrobora com alguns trabalhos presentes na literatura que descrevem a presença de ER α em ameloblastos (Ferrer et al., 2005; Jedeon et al., 2014; Houari et al., 2016). O estudo de Houari et al. (2016) ainda destaca o estágio de maturação com

maior presença da imunoexpressão de ER α . Diversos autores têm ressaltado a associação da deficiência de estrógeno com defeitos de esmalte (Takeshita et al., 2004; Kakei et al., 2013; Arid et al., 2019) e, apesar da amelogênese não estar relacionada diretamente com a erupção dentária (Jain e Rathee, 2019), alterações no processo de secreção e maturação de esmalte ocasionam respectivamente, alterações quantitativas e qualitativas no esmalte dentário (Patel et al., 2019). Com isso, há um impacto significativo nas funções oclusais (Lopes et al., 2018), podendo propiciar um desvio na taxa de erupção dentária, como descrito anteriormente.

Em relação a quantificação da expressão gênica das proteínas codificadoras de ER α (*ERS1*), o resultado não demonstrou diferença entre os grupos OVX e SHAM na região odontogênica. Deste modo, é possível sugerir que, mesmo que a taxa de erupção dentária sofra influência indireta dos defeitos de esmalte ocasionados pela deficiência de estrógeno, seus receptores não estariam sendo modulados pela ação do estrógeno. É válido ressaltar que a sinalização do estrógeno pode ser decorrente da interação tanto a nível nuclear quanto na membrana plasmática (Eyster, 2016; Hewitt et al., 2016; Hamilton et al., 2017). A nível nuclear, a principal via de sinalização, conhecida como genômica, é descrita por meio da ligação direta do estrógeno a elementos reguladores do DNA (Saville et al., 2000; Hewitt et al., 2016). Já a nível de membrana plasmática, a ação do estrógeno pode ser efetuada por meio de três mecanismos de regulação transcricional que são capazes de conduzir as respostas hormonais aos tecidos alvo (Hewitt et al., 2016; Hamilton et al., 2017). Os ERs associados à membrana plasmática medeiam a via de sinalização não-genômica (Nadal et al., 2001; Hewitt et al., 2016; Hamilton et al., 2017).

A via de sinalização não-genômica, especificamente, pode ser realizada pela inibição das vias de sinalização MAPK/ERK ou AKT, por meio do ER α e/ou pelos receptores da proteína G (GPR30) (Prossnitz et al., 2007; Hewitt et al., 2016; Hamilton et al., 2017). A proteína G está localizada no lado citosólico da membrana plasmática, se une a um nucleotídeo, o GTP (trifosfato de guanossina), estimulando a produção de cAMP e se disponibilizando para uma nova interação com o complexo hormônio-receptor. Como as diferentes células têm receptores específicos para os diferentes hormônios, o cAMP opera como um metabólito comum para a ação de vários hormônios. Assim, cada célula tem diferentes enzimas que reconhecem diferentes

hormônios, mas que são afetadas pelo cAMP. Essa via de sinalização pode ser descrita como via intracelular não nuclear e de ação rápida (Hewitt et al., 2016; Hamilton et al., 2017). Contudo, a ação do estrógeno também pode estar vinculada a ação do hormônio de crescimento (GH) indiretamente por meio de um mecanismo de amarração aos locais de ligação de *AP1* ou *SP1* (GC) para regular a transcrição. Assim, os fatores de crescimento (IGF, EGF) podem fosforilar ER por meio das vias de sinalização intracelular mediadas pelo receptor do fator de crescimento de membrana (GFR) e regular a expressão gênica na ausência de ligante (Hewitt et al., 2016; Hamilton et al., 2017).

O GH é um hormônio produzido pelos somatotrofos no lobo anterior da hipófise, é liberado na circulação e liga-se a receptores nos tecidos-alvo com o objetivo de estimular o crescimento (Magalhães et al., 2012). A secreção de GH ocorre em pulsos e é controlada pelo hipotálamo por meio do hormônio liberador do GH (GHRH), da somatostatina e da ghrelina. A somatostatina exerce um efeito inibitório, enquanto o GHRH e a ghrelina estimulam a secreção de GH por intermédio de receptores específicos distintos acoplados à proteína G (Rosicka et al., 2002). Conforme descrito por Hutchinson et al. (1988), o GH age sobre as células da granulosa acelerando o processo de diferenciação das células foliculares em células luteínicas (Magalhães et al., 2012).

Em relação à imunoexpressão de ER β , nossos resultados demonstram a presença do ER β em células da papila dentária no grupo OVX e em células do tecido de sustentação de ambos os grupos. O ER β possui um padrão de expressão mais limitando (Hamilton et al., 2017). Diferentemente do ER α , a via de sinalização ocorre apenas a nível nuclear (Levin, 2015; Hamilton et al., 2017). Desta forma, é possível sugerir que via de sinalização do ER β seja dependente do ligante. Corroborando com nossos resultados, um estudo *in vitro*, também observou a presença de ER β em células-tronco da polpa dentária de dentes humanos. O estudo ainda descreveu o potencial de diferenciação pró-osteogênico associado a reposição hormonal com estradiol, em condições de cultura apropriadas (Alhodhodi et al., 2017). Faz-se importante destacar que região da alça cervical do incisivo é formada por células mesenquimais, e com isso, possuem células-tronco com capacidades de

autorrenovação e potencial de diferenciação (Botelho et al., 2017; Morsczeck et al., 2018).

Nossos resultados também demonstram imunexpressão de ER β em células do ligamento periodontal. As células provenientes do ligamento periodontal também foram caracterizadas como células com capacidade de se replicar indefinidamente (Seaberg e van der Kooy, 2003; Huang, Gronthos, Shi, 2009). Deste modo, é importante ressaltar que a deficiência de estrógeno já foi descrita com potencial de ocasionar uma diminuição de células-tronco e, conseqüentemente, diminuição do potencial de diferenciação celular (Heo et al, 2015; Wu et al., 2018). Assim, sugere-se que tal associação poderia ocasionar um retardo da erupção dentária por deficiência nas estruturas que regem esse processo. Alguns trabalhos apontam distúrbios da erupção dentária induzidos por deficiências no ligamento periodontal ocasionados pela deficiência de estrógeno (Popova et al., 2007; E et al., 2016). Bem como, osso alveolar e conformidade radicular (Ahiko et al., 2019; Nakayama et al., 2018; Maier et al., 2019).

A partir do tecido de sustentação, foi possível observar a presença da imunexpressão de ER β em cementoblastos. Liao et al. (2016), corrobora com nossos resultados e ainda descreve a participação do estrógeno na diferenciação sistemática dos cementoblastos. Embora a pesquisa sobre o comprometimento de células de células-tronco mesenquimais tenha sido extensivamente estudada, a diferenciação de cementoblastos não é bem elucidada. Alguns autores justificam o impasse pela dificuldade de marcar e isolar seletivamente essa população de células (Matthews et al., 2016). Contudo, é importante ressaltar a presença de imunexpressão do ER β em cementoblastos uma vez que o cemento desempenha papéis essenciais na manutenção da estabilidade periodontal (Bartold et al., 2000; Consolaro, 2013). Além disso, pode estar associado a erupção dentária no modelo murino uma vez que os feixes do ligamento periodontal na face lingual do incisivo podem responder de forma pertinente às cargas mastigatórias (Park et al., 2014).

Um resultado interessante a ser destacado na imunexpressão de ER α e ER β é ausência de marcação no folículo dentário e osso alveolar. As células do folículo dentário assim como as células da papila dentária, apresentam características similares em termos de diferenciação (Seaberg e van der Kooy, 2003; Huang, Gronthos, Shi,

2009). Já o osso alveolar, possui respaldo abundante na literatura em detrimento da presença de ER α e ER β com efeito pró-osteogênico (Al-Sherbini et al., 2014; Khalid e Krum, 2016; Macari et al., 2016; Vinel et al., 2018; Bobek et al., 2020). Além disso, diversos pesquisadores ressaltam que a teoria da remodelação óssea seja a mais condizente com o processo de erupção dentária devido à sinalização proveniente do folículo dentário e a formação da via de erupção (Marks; Cahill, 1987; Wise; Fan 1989; Arai et al., 1999; Que; Lumpkin; Wise, 1999; Wise; King, 2008; Liu; Wise, 2008; Wise, 2009; Yao et al., 2010; Wise et al., 2011; Yao et al., 2013, Chen et al., 2016). Porém, no modelo murino, a região do folículo dentário na porção final da região odontogênica, envolve principalmente os ameloblastos. Essa parte do tecido conjuntivo periodontal simplesmente se comporta protegendo a base do dente contra lesões, uma vez que o caminho eruptivo já estaria formado (Matěna, 1972). Sugere-se que seja realizado um acompanhamento em molares no modelo murino, que remeterão resultados mais fiéis a essa fase da odontogênese humana.

Em relação a expressão gênica, nossos resultados demonstraram um aumento da expressão de ER β (*ESR2*) no grupo OVX. Desta forma, é possível sugerir que via de sinalização seja dependente do ligante e que, o aumento da expressão gênica seja decorrente do mecanismo de amplificação de sinais para captação do ligante e conseqüentemente, desempenho funcional nos tecidos-alvo (Liu et al., 2016). Assim como demonstram nossos resultados, o aumento da expressão gênica de *ESR2* também foi observada em tecidos contendo células-tronco de origem mesenquimal provenientes da medula óssea (Balla et al., 2019).

O aumento da expressão gênica de *ESR2* no grupo OVX reduz significativamente a capacidade de diferenciação das células-tronco (Balla et al., 2019). Nos dentes com erupção contínua, sugere-se que essa redução ocasione desvios significativos na odontogênese e conseqüentemente na taxa de erupção. No entanto, o estudo também destaca a fisiologia endócrina como adjuvante nesses resultados. Isto é, a ovariectomia leva a um nível sérico elevado do hormônio folículo estimulante (FSH) (Yen e Tsai, 1971). De acordo com dados recentes, os receptores de FSH (FSHR) foram localizados principalmente nos precursores de osteoclastos e também na superfície das células-tronco mesenquimais (Chin, 2018), portanto a ligação do FSH ao seu receptor pôde melhorar a formação e diferenciação dos osteoclastos, prejudicando a

formação osteogênica na medula óssea (Balla et al., 2019). Sugere-se que esse mecanismo também seja capaz de gerar estímulos semelhantes em células da papila dentária.

É sabido que os ERs têm pouca sobreposição funcional (Balla et al., 2019) e as eventuais interações com os ER β não podem ser excluídas. As alterações específicas da medula óssea identificadas no padrão de expressão gênica sugerem a existência de receptores ativos, assim como nossos resultados. Sendo assim, é possível sugerir que haja falha no processo de erupção dentária não somente pela ação do GH por meio dos ER α , mas, pela ação direta do ER β . Consideramos que nossos resultados contribuirão para uma compreensão mais profunda das alterações na taxa de erupção dentária e odontogênese desencadeadas pela deficiência de estrógeno. Deste modo, ressalta-se a importância do acompanhamento endócrino conjunto ao acompanhamento odontológico no qual a deficiência de estrógeno poderá auxiliar na identificação e em intervenções terapêuticas com alto impacto no tratamento odontopediátrico futuramente.

5.5 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

- A análise da taxa de erupção dentária na deficiência de estrógeno poderia ter sido mensurada também em animais submetidos a condição de normofunção conforme descrito por diversos autores (Miwa et al., 2013; Araújo et al., 2014; Chidiac et al., 2018; Chidiac et al., 2019). No entanto, o número de animais distribuídos em três grupos poderia ocasionar resultados insuficientes perante o número amostral.

- Destaca-se a dificuldade de individualização das porções inicial, média e final da região odontogênica, uma vez que cada animal apresenta suas particularidades anatômicas, mesmo sendo um modelo padronizado.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

A hipótese nula foi rejeitada. A deficiência de estrógeno demonstrou influência negativa na taxa de erupção em dentes em condição de hiperfunção. No entanto, apesar de ER α e ER β estarem presentes na região odontogênica em ambos os grupos, sugere-se que o ER β está diretamente relacionado ao retardo da erupção dentária na deficiência de estrógeno.

Referências

REFERÊNCIAS ¹

Ahiko N, Baba Y, Tsuji M, Horikawa R, Moriyama K. Investigation of maxillofacial morphology and oral characteristics with Turner Syndrome and early mixed dentition. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2019; 59(1): 11-17.

Aladdin QI, Burn-Murdoch Ra. Techniques for choosing reference points from which to measure eruption rates of rat incisors. *Archs oral Biol*. 1985b; 30: 531-537.

Alhodhodi A, Alkharobi H, Humphries M, Alkhafaji H, El-Gendy R, Feichtinger G, et al. Oestrogen receptor β (ER β) regulates osteogenic differentiation of human dental pulp cells. *J esteróide Biochem Mol Biol*. 2017; 174: 296-302.

Almeida M, Laurent MR, Dubois V, Claessens F, O'Brien CA, Bouillon R, et al. Estrogens and androgens in skeletal physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2017; 97(1): 135-187.

Ames MS, Hong S, Lee HR, Fields HW, Johnston WM, Kim DG. Estrogen deficiency increases variability of tissue mineral density of alveolar bone surrounding teeth. *Arch Oral Biol*. 2010; 55(8): 599–605.

Almonaitiene R, Balciuniene I, Tutkuvienė J. Factors influencing permanent teeth eruption. Part one - general factors. *Stomatologija*. 2010; 12(3): 67-72.

Al-Sherbini MM, Al-Zahrani MS, Alrefaie ZA, Amin HA, Zawawi KH. Estrogen deficiency reduces the expression of estrogen receptor-beta in Wistar rats periodontal tissues. *Saudi Med J*. 2014; 35(3): 242-7.

Arai F, Miyamoto T, Ohneda Ó, Inada T, Brasel K, Miyata T, et al. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J Exp Med*. 1999; 190(12): 1741-54.

Araújo AMM, Gomes CC, de Almeida SM, Klamt CB, Novaes PD. Effect of radiotherapy on the eruption rate and morphology of the odontogenic region of rat incisors. *Archives of oral biology*. 2014; 59(11): 1242-1248.

¹ De acordo com o Manual de Diretrizes para Apresentação de Dissertação e Teses da Universidade de São Paulo/Sistema Integrado de Bibliotecas de 2016, baseado no estilo Vancouver, e abreviatura dos títulos de periódicos em conformidade com o Index Medicus.

Arid J, Oliveira DB, Evangelista SS, Vasconcelos KRF, Dutra ALT, de Oliveira SS, et al. Oestrogen receptor alpha, growth hormone receptor, and developmental defect of enamel. *Int J Paediatr Dent.* 2019; 29(1): 29-35.

Balla B, Sárvári M, Kósa JP, Kocsis-Deák B, Tobiás B, Árvai K, et al. Long-term selective estrogen receptor-beta agonist treatment modulates gene expression in bone and bone marrow of ovariectomized rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019; 188: 185-194.

Barros RP, Gustaffson JA. Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell Metab.* 2011; 14(3): 289-99.

Bartold PM, Mcculloch CAG, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontology 2000.* 2000; 24(1): 253–269.

Ben-Hur H, Mor G, Blickstein I, Likhman I, Kohen F, Dgani R, et al. Localization of estrogen receptors in long bones and vertebrae of human fetuses. *Calcif Tissue Int.* 1993; 53(2): 91-6.

Berkovitz BK. The effect of root transection and partial root resection on the unimpeded eruption rate of the rat incisor. *Arch Oral Biol.* 1971; 16(9): 1033-43.

Berkovitz BK, Thomas NR. Unimpeded eruption in the root-resected lower incisor of the rat with a preliminary note on root transection. *Arch Oral Biol.* 1969; 14(7): 771-80.

Blanchard O, Tsagris L, Rappaport R, Duval-Beaupere G, Corvol M. Age-dependent responsiveness of rabbit and human cartilage cells to sex steroids in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 40(4-6): 711–6.

Bobek J, Oralova V, Lesot H, Kratochvilova A, Doubek J, Matalova E. Onset of calciotropic receptors during the initiation of mandibular/alveolar bone formation. *Ann Anat.* 2020; 227: 151427.

- Botelho J, Cavacas MA, Machado V, Mendes JJ. Dental stem cells: recent progresses in tissue engineering and regenerative medicine. *Ann Med*. 2017; 49(8): 644-651.
- Bryer, LW. An experimental evaluation of the physiology of tooth eruption. *Int. Dent. J*. 1957; 7: 432–478.
- Canger EM, Celenk P, Devrim I, Avşar A. Oral findings of Rothmund-Thomson Syndrome. *Case Rep Dent*. 2013.
- Cato ACB, Nestl A, Mink S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE* 2002; (138): re9.
- Chandna S, Bathla M. Oral manifestations of thyroid disorders and its management. *Indian J Endocrinol Metab*. 2011; 15(2): S113–S116.
- Cheek CC, Paterson RL, Proffit WR. Response of erupting human second premolars to blood flow changes. *Arch Oral Biol*. 2002; 47(12): 851-8.
- Chen C, Xie N, Ling J, Du Y, Gu H. Proteomic analysis of the effects of CSF-1 and IL-1 α on dental follicle cells. *Mol Med Rep*. 2016; 14(3): 2405-14.
- Chen GX, Cai C, Liu J, Wen L, Wang X, Ding Y. Impact of estrogen-related receptor α on the biological characteristics of rat mandibular condylar chondrocytes. *Mol Med Rep*. 2014; 10(1): 195-202.
- Chidiac, JJ, Kassab A, Rifai K, Al-Chaer ED, Saadé NE. Contribution of capsaicin-sensitive innervation to the continuous eruption of the rat mandibular incisors. *Anatomical science international*. 2019; 94(1): 136-143.
- Chidiac JJ, Kassab A, Rifai K, Saadé NE, Al Chaer ED. Modulation of incisor eruption in rats by sympathetic efferents. *Archives of oral biology*. 2018; 89:31-36.
- Chin KY. The relationship between follicle-stimulating hormone and bone health: alternative explanation for bone loss beyond oestrogen? *Int J Med Sci*. 2018; 15(12): 1373-1383.

Christ JP, Gunning MN, Palla G, Eijkemans MJC, Lambalk CB, Laven JSE, et al. Estrogen deprivation and cardiovascular disease risk in primary ovarian insufficiency. *Fertil Steril*. 2018.

Clegg D, Hevener AL, Moreau KL, Morselli E, Criollo A, Van Pelt RE, et al. Sex Hormones and Cardiometabolic Health: Role of Estrogen and Estrogen Receptors. *Endocrinology*. 2017 May 1;158(5):1095-1105.

Consolaro A. The four mechanisms of dental resorption initiation. *Dental Press J. Orthod*. 2013; 18(3): 7-9.

Cui H, Zhu Y, Jiang D. The RIP1-RIP3 complex mediates osteocyte necroptosis after ovariectomy in rats. *Plos One*. 2016; 11(3): e0150805.

Darbre PD. Endocrine disruptors and obesity. *Curr Obes Rep*. 2017; 6(1): 18-27.

Davey RA, MacLean HE, McManus JF, Findlay DM, Zajac JD. Genetically modified animal models as tools for studying bone and mineral metabolism. *J Bone Miner Res*. 2004; 19(6): 882-92.

Davidopoulou S, Chatzianni A. Craniofacial morphology and dental maturity in children with reduced somatic growth of different aetiology and the effect of growth hormone treatment. *Prog Orthod*. 2017; 18(1): 10.

Demirjian A, Goldstein H, Tanner JM. A new system of dental age assessment. *Hum Biol*. 1973; 45: 211-27

de Morais Gallarreta FW, Bernardotti FP, de Freitas AC, de Queiroz AM, Faria G. Characteristics of individuals with hydrocephalus and their dental care needs. *Spec Care Dentist*. 2010; 30(2): 72-6.

Drevensek M, Volk J, Sprogar S, Drevenšek G. Orthodontic force decreases the eruption rate of rat incisors *Eur J Orthod*. 2009; 31(1): 46-50.

Dorotheou D, Farsadaki V, Bochaton-Piallat ML, Giannopoulou C, Halazonetis T, Kiliaridis S. Increased Cell Proliferation and Gene Expression of Genes Related to Bone Remodeling, Cell Adhesion and Collagen Metabolism in the Periodontal Ligament of Unopposed Molars in Growing Rats. *Front Physiol.* 2017; 8: 75.

Ejiri, S, Tanaka M, Watanabe N, Anwar RB, Yamashita E, Yamada K, et al. Estrogen deficiency and its effect on the jaw bones. *Journal of Bone and Mineral Metabolism.* 2008; 26(5): 409–415.

E LL, Xu WH, Feng L, Liu Y, Cai DQ, Wen N, et al. Estrogen enhances the bone regeneration potential of periodontal ligament stem cells derived from osteoporotic rats and seeded on nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide). *Int J Mol Med.* 2016; 37(6): 1475-86.

Eyster KM. The estrogen receptors: an overview from different perspectives. *Methods Mol Biol.* 2016; 1366:1-10.

Ferreira MCF, Souza KZD, Dummont JSF, Barra AA, Rocha ALL. Moduladores seletivos do receptor estrogênico: novas moléculas e aplicações práticas. *Femin.* 2011; 39(9).

Ferrer VL, Maeda T, Kawano Y. Characteristic distribution of immunoreaction for estrogen receptor alpha in rat ameloblasts. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2005; 284(2): 529-36.

Filipsson R, Lindsten J, Almqvist S. Time of eruption of the permanent teeth, cephalometric and tooth measurement and sulphation factor activity in 45 patients with turner's syndrome with different types of x chromosome aberrations. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1965; 48: 91-113.

Frost HM, Jee WS. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner.* 1992; 18(3): 227–36.

Gerlach RF, Toledo DB, Fonseca RB, Novaes PD, Line SR, Merzel J. Alveolar bone remodelling pattern of the rat incisor under different functional conditions as shown by minocycline administration. *Arch Oral Biol.* 2002; 47(3): 203-9.

Gerlach RF, Toledo DB, Novaes PD, Merzel J, Line, SRP. The effect of lead on the eruption rates of incisor teeth in rats. *Archives of oral biology*. 2000; 45(11): 951-955.

Gevers EF, Wit JM, Robinson IC. Effect of gonadectomy on growth and GH responsiveness in dwarf rats. *J Endocrinol*. 1995; 145(1): 69–79.

Gomes JR, Omar NF, Do Carmo ER, Neves JS, Soares MAM, Narvaes EA, et al. Relationship between cell proliferation and eruption rate in the rat incisor. *The Anatomical Record*. 2013; 296(7): 1096-1101.

Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 1986; 320(6058): 134–9.

Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med*. 2002; 346(5): 340–52.

Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem*. 2001; 276(40): 36869-72.

Hamilton KJ, Hewitt SC, Arao Y, Korach KS. Estrogen hormone biology. *Curr Top Dev Biol*. 2017; 125:109-146.

Hao L, Li J, Tian Y, Wu J. Changes in the MicroRNA Profile of the mandibule of ovariectomized mice. *Cell Physiol Biochem*. 2016; 38(4): 1267-87.

Hass AD, Simmons KE, Davenport ML, Proffit WR. The effect of growth hormone on craniofacial growth and dental maturation in Turner syndrome. *The Angle Orthodontist*, 2001; 71(1): 50-59.

Hess RA, Fernandes SA, Gomes GR, Oliveira CA, Lazari MF, Porto CS. Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. *J Androl*. 2011; 32(6): 600-13.

Heo HR, Chen, An B, Kim KS, Ji J, Hong SH. Hormonal regulation of hematopoietic stem cells and their niche: a focus on estrogen. *Int J Stem Cells*. 2015; 8(1): 18–23.

Hewitt SC, Winuthayanon W, Korach KS. What's new in estrogen receptor action in the female reproductive tract. *J Mol Endocrinol*. 2016; 56(2): R55-71.

Hong SH, Nah HY, Lee YJ, Lee JW, Park JH, Kim SJ, et al. Expression of estrogen receptor-alpha and -beta, glucocorticoid receptor, and progesterone receptor genes in human embryonic stem cells and embryoid bodies. *Cel Mol*. 2004; 18: 320-325.

Houari S, Loiodice S, Jedeon K, Berdal A, Babajko S. Expression of steroid receptors in ameloblasts during amelogenesis in rat incisors. *Front Physiol*. 2016; 2(7): 503

Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009; 88(9): 792-806.

Huber KL, Suri L, Taneja P. Eruption disturbances of the maxillary incisors: a literature review. *J Clin Pediatr Dent*. 2008; 32(3): 221-30.

Hutchinson LA, Findlay JK, Herington AC. Growth hormone and insulin-like growth factor-I accelerate PMSG-induced differentiation of granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1988; 55: 61-69.

Jain P, Rathee M. Anatomy, head and neck, tooth eruption. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019.

Jedeon K, Loiodice S, Marciano C, Vinel A, Canivenc Lavier MC, Berdal A. Estrogen and bisphenol A affect male rat enamel formation and promote ameloblast proliferation. *Endocrinology*. 2014; 155(9): 3365-75.

Kabir ER, Rahman MS, Rahman I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015; 40(1): 241-58.

Takei M, Sakae T, Yoshikawa M. Combined effects of estrogen deficiency and cadmium exposure on calcified hard tissues: animal model relating to itai-itai disease in postmenopausal women. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2013; 89(7): 340-7.

Katzenellenbogen BS, Montano MM, Ediger TR, Sun J, Ekena K, Lazennec G, Martini PG, et al. Estrogen receptors: selective ligands, partners, and distinctive pharmacology. *Recent Prog Horm Res.* 2000; 55: 163-93.

Khalid AB, Krum SA. Estrogen receptors alpha and beta in bone. *Bone.* 2016; 87: 130-5.

Kiyama R, Wada-Kiyama Y. Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. *Environ Int.* 2015; 83: 11-40.

Kos M, Reid G, Denger S, Gannon F. Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol Endocrinol* 2001; 15(12): 2057–63.

Krum SA, Miranda-Carboni GA, Hauschka PV, Carroll FS, Lane TF, Freedman LP, et al., Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival. *Embo j.* 2008; 27(3): 535-45.

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(12): 5925–30.

Kula K, Walczak-Jedrejowska R, Słowikowska-Hilczler J, Wranicz JK, Kula P, Oszukowska E, et al. Important functions of estrogens in men-breakthrough in Contemporary medicine. *Przegl Lek.* 2005; 62(9): 908-15.

Lee CK, Law KT, King NM, Rabie ABM. A comparison between a conventional optical method and image-analysis for measuring the unimpeded eruption rate of the rat mandibular incisor. *Archives of Oral Biology* 47. 2002; 555–562.

Lee DG, Kim TW, Kang SC, Kim ST. Estrogen receptor gene polymorphism and craniofacial morphology in female TMJ osteoarthritis patients. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 35(2): 165-9.

Leeners B, Geary N, Tobler PN, Asarian L. Ovarian hormones and obesity. *Hum Reprod Update.* 2017 May 1;23(3):300-321.

Levin ER. Extranuclear steroid receptors are essential for steroid hormone actions. *Annual Review of Medicine*. 2015; 66(66): 271–280.

Liao J, Zhou Z, Huang L, Li Y, Li J, Zou S. 17 β -estradiol regulates the differentiation of cementoblasts via Notch signaling cascade. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 477(1): 109-114.

Litsas G. Growth Hormone and Craniofacial Tissues. An update. *Open Dent J*. 2015; 9: 1–8.

Liu D, Wise GE. Expression of endothelial monocyte-activating polypeptide II in the rat dental follicle and its potential role in tooth eruption. *Eur J Oral Sci*. 2008;116(4):334-40.

Liu XL, Li CL, Lu WW, Cai WX, Zheng LW. Skeletal site-specific response to ovariectomy in a rat model: change in bone density and microarchitecture. *Clin Oral Implants Res* 2015; 26(4): 392–8.

Liu Z, Liu L, Kang C, Xie Q, Zhang B, Li Y. Effects of estrogen deficiency on microstructural changes in rat alveolar bone proper and periodontal ligament. *Mol Med Rep*. 2015; 12(3): 3508-3514.

Lopes CMI, Cavalcanti MC, Alves e Luna AC, Marques KMG, Rodrigues MJ, DE Menezes VA. Enamel defects and tooth eruption disturbances in children with sickle cell anemia. *Braz Oral Res*. 2018; 32: e87

Lorimier CR. The effect of the sex steroids on the rate of tooth eruption in the rat maxillary incisor. Master's Theses. 1972

Lu Y, Jin L, Lei G, Fu Y, Wang Y, Yu J. Estrogen-mediated dental tissue regeneration. *Histol Histopathol*. 2016; 31(12): 1281-9.

Macari S, Ajay Sharma L, Wyatt A, Knowles P, Szawka RE, Garlet GP, et al. Osteoprotective effects of estrogen in the maxillary bone depend on ER α . *J Dent Res*. 2016; 95(6): 689-96.

Macari S, Duffles LF, Queiroz-Junior CM, Madeira MF, Dias GJ, Teixeira MM, et al. Oestrogen regulates bone resorption and cytokine production in the maxillae of female mice. *Arch Oral Biol.* 2015; 60(2): 333-41.

McCauley LK, Tözüm TF, Rosol TJ. Estrogen receptors in skeletal metabolism: lessons from genetically modified models of receptor function. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2002; 12(2): 89-100.

Magalhães DM, Sales ET, Padilha RT, Silva TFP, Tonioli R, Figueiredo FR. Growth Hormone (GH) and Insulin-like growth factor I (IGF-I): major regulators of folliculogenesis in vivo and in vitro. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 2012; 36(1): 32-38.

Maier C, Dumančić J, Brkić H, Kaić Z, Savić Pavičin I, et al. tooth crown morphology in turner and klinefelter syndrome individuals from a croatian sample. *Acta Stomatol Croat.* 2019; 53(2): 106-118.

Manokawinchoke J, Ritprajak P, Osathanon T, Pavasant P. Estradiol induces osteoprotegerin expression by human dental pulp cells. *Odontology.* 2016; 104(1): 10-8.

Marks Jr SC, Cahill DR. Experimental study in the dog of the non-active role of the tooth in the eruptive process. *Arch Oral Biol.* 1984; 29: 311-322.

Marks Jr SC, Cahill DR. Regional control by the dental follicle of alterations in alveolar bone metabolism during tooth eruption. *J Oral Pathol.* 1987; 16(4): 164-9.

Marks SC Jr, Schroeder HE. Tooth eruption: theories and facts. *Anat Rec.* 1996; 245(2): 374-93.

Márquez-Hernández RA, Ohtani J, Fujita T, Sunagawa H, Kawata T, Kaku M, et al. Sex hormones receptors play a crucial role in the control of femoral and mandibular growth in newborn mice. *Eur J Orthod* 2011b; 33(5): 564–9.

Martin-Millan M, Almeida M, Ambrogini E, Han L, Zhao H, Weinstein RS, et al. The estrogen receptor- α in osteoclasts mediates the protective effects of estrogens on cancellous but not cortical bone. *Mol Endocrinol.* 2010; 24(2): 323-34.

- Matěna V. The periodontium of the enamel aspect of the rat incisor. *J. Periodont.* 1972; 43, 311–315.
- Matthews BG, Roguljic H, Franceschetti T, Roeder E, Matic I, Vidovic I. Gene-expression analysis of cementoblasts and osteoblasts. *J Periodontal Res.* 2016; 51(3): 304-12.
- Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocr Rev.* 2013; 34(3): 309-38.
- Merzel J, Novaes PD. Development of functional dentin incisors after a partial resection of the odontogênica organ of rat incisors. *Arch Oral Biol.* 2006; 51 (10): 825-835.
- Midtbo M, Halse A. Skeletal maturity, dental maturity, and eruption in young patients with Turner syndrome. *Acta Odontol Scand.* 1992; 50(5): 303-12.
- Miwa T, Matsuzaka K, Inoue T. Effect of interrupted eruption on the enamel organ of the rat incisor. *Zoology (Jena).* 2013; 116(2): 90-8.
- Morsczeck C, Reichert TE. Dental stem cells in tooth regeneration and repair in the future. *Expert Opin Biol Ther.* 2018; 18(2): 187-196.
- Moulton VR. Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease. *Front Immunol.* 2018 Oct 4;9:2279.
- Moxham BJ, Berkovitz BKB. The periodontal ligament and physiological tooth movements. In: Berkovitz, BKB., Moxham, BJ., Newman, HN (Eds.), *The Periodontal London, Ligament in Health and Disease Mosby-Wolfe*, 1995.
- Nadal A, Ropero AB, Fuentes E, Soria B, The plasma membrane estrogen receptor: nuclear or unclear? *Trends Pharmacol Sci.* 2001; 22: 597–599.
- Nakayama M, Kondo O, Pesonen P, Alvesalo L, Lähdesmäki R. Influence of long and short arms of X chromosome on maxillary molar crown morphology. *PLoS One.* 2018; 13(11): e0207070.
- Nanci A. *Ten cate's oral histology: development, structure, and function.* St. Louis (MO): Elsevier Health Sciences. 2014.

Nelson ER, Habibi HR. Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *Gen Comp Endocrinol.* 2013; 192: 15–24.

Nilsson S, Gustafsson JA. Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clin Pharmacol Ther.* 2011; 89(1): 44–55.

Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 2001; 81(4): 1535-65.

Ochi Y, Yamada H, Mori H, Kawada N, Kayasuga R, Nakanishi Y, et al. ONO-5334 a cathepsin K inhibitor, improves bone strength by preferentially increasing cortical bone mass in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab.* 2014; 32(6): 645-52.

Ojeda SR, Wheaton JE, Jameson HE, McCann SM. The onset of puberty in the female rat: changes in plasma prolactin, gonadotropins, luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH), and hypothalamic LHRH content. *Endocrinology.* 1976; 98(3): 630-8.

Omar NF, Gomes JR, Neves JS, Novaes PD. Effects of loss of occlusal contact on the expression of matrix metalloproteinase-2, membrane type 1-MMP, tissue inhibitor of the MMP-2, eruption rate, organization and resistance of collagen fibers of the rat incisor periodontal ligament. *J Periodontal Res.* 2018; 53(1): 40-46.

Omar NF, Gomes JR, Neves JS, Salmon CR, Novaes PD. MT1-MMP expression. On the odontogenic region of rat incisors undergoing interrupted eruption. *J Mol Histol.* 2011; 42(6): 505-11.

Orrico SR, Gonçalves D, Galeazzi ST, Giro G, Takayama L, Pereira RM. The influence of loss of bone mass on induced periodontal disease: a radiographic and densitometric study of female rats. *J Periodontol.* 2005; 76(9): 1436-42.

Park CH, Kim KH, Rios HF, Lee YM, Giannobile WV, Seol YJ. Spatiotemporally controlled microchannels of periodontal mimic scaffolds. *J Dent Res.* 2014; 93(12): 1304-12.

Patel A, Aghababae S, Parekh S. Hypomineralisation or hypoplasia? *Br Dent J.* 2019; 227(8): 683-686.

- Patel S, Homaei A, Raju AB, Meher BR. Estrogen: The necessary evil for human health, and ways to tame it. *Biomed Pharmacother.* 2018; 102: 403-411.
- Paterni I, Granchi C, John A. Katzenellenbogen JA, Minutolo F. Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids.* 2014; 15(0): 13-29.
- Piccinato CA, Neme RM, Torres N, Sanches LR, Derogis PBMC, Brudniewski HF et al. Effects of steroid hormone on estrogen sulfotransferase and on steroid sulfatase expression in endometriosis tissue and stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016; 158: 117-126.
- Planey SL, Kumar R, Arnott JA. Estrogen receptors (ERalpha versus ERbeta): friends or foes in human biology? *J Recept Signal Transduct Res.* 2014; 34(1): 1-5.
- Proffit WR, Frazier-Bowers SA. Mechanism and control of tooth eruption: overview and clinical implications. *Orthod Craniofac Res.* 2009; 12(2): 59-66.
- Polur I, Kamiya Y, Xu M, Cabri BS, Alshabeeb M, Wadhwa S, et al. Oestrogen receptor beta mediates decreased occlusal loading induced inhibition of chondrocyte maturation in female mice. *Arch Oral Biol.* 2015; 60(6): 818-24.
- Popova SN, Barczyk M, Tiger CF, Beertsen W, Zigrino P, Aszodi A, et al. Alpha11 beta1 integrin-dependent regulation of periodontal ligament function in the erupting mouse incisor. *Mol Cell Biol.* 2007; 27(12): 4306-16.
- Prossnitz ER, Arterburn JB, Sklar LA. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 265-266: 138-42.
- Que BE, Lumpkin SJ, Wise, GE. Implications for tooth eruption of the effect of interleukin-1a on nuclear factor-kB gene expression in the rat dental follicle. *Archives of Oral Biology* 44. 1999; 961-967.
- Reis FM, Bloise E, Ortiga-Carvalho TM. Hormones and pathogenesis of uterine fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2016; 34: 13-24.

Roberts MW, Li SH, Cutler JR GB, Hench KD, Loriaux L. Sex differences in dental development in children with precocious puberty related to central nervous system lesions. *Pediatric Dentistry*. 1986; 8(4): 276-279.

Rogers NH, Perfield JW, Strissel KJ, Obin MS, Greenberg AS. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. *Endocrinology*. 2009; 150(5): 2161-8.

Romualdo PC, Lucisano MP, Paula-Silva FWG, Leoni GB, Sousa-Neto MD, Silva RAB et al. Ovariectomy Exacerbates Apical Periodontitis in Rats with an Increase in Expression of Proinflammatory Cytokines and Matrix Metalloproteinases. *J Endod*. 2018; 44(5):780-785.

Rosicka M, Krsek M, Jarkovska Z, Marek J, Schreiber V. Ghrelin - a new endogenous growth hormone secretagogue. *Physiol Res*. 2002; 51: 435-41.

Saito K, Cui H. Emerging roles of estrogen-related receptors in the brain: potential interactions with estrogen signaling. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(4): pii: E1091.

Sasaki, KT, Delbem ACB, Santos OAMD, Shimabucoro CE, Nakamune ACDMS, Bedrande-Castro JC, Oliveira-Filho RM. Neuroendocrine alterations impair enamel mineralization, tooth eruption and saliva in rats. *Pesqui Odontol Bras*. 2003; 17(1): 5-10.

Saville B, Wormke M, Wang F, Nguyen T, Enmark E, Kuiper G. Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J Biol Chem*. 2000; 275: 5379-5387.

Scaramucci T, Guglielmi CAB, Fonoff RD, Zardetto CGD. Oral manifestation associated with multiple pituitary hormone deficiency and ectopic neurohypophysis. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 2011; 35(4), 409-414.

Seaberg RM, van der Kooy D. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci*. 2003; 26(3): 125-31.

- Shimada A, Komatsu K, Chiba M. Effects of local injections of vasoactive drugs on eruption rate of incisor teeth in anaesthetized rats. *Archives of oral biology*. 2006; 51(6): 449-456.
- Silva MAD, Vasconcelos DFP, Marques MR, Barros SP. Parathyroid hormone intermittent administration promotes delay on rat incisor eruption. *Archives of oral biology*. 2016; 69: 102-108.
- Steffens JP, Santana LCL, Pitombo JCP, Ribeiro DO, Albaricci MCC, Warnavin SVSC, et al. The role of androgens on periodontal repair in female rats. *J Periodontol*. 2018; 89(4): 486-495.
- Subramanian H, Döring F, Kollert S, Rukoyatkina N, Sturm J, Gambaryan S et al. PTH1R mutants found in patients with primary failure of tooth eruption disrupt g-protein signaling. *Plos One*. 2016; 29:(11): e0167033.
- Sukocheva OA. Estrogen, estrogen receptors, and hepatocellular carcinoma: Are we there yet? *World J Gastroenterol*. 2018;24(1):1-4.
- Suri L, Gagari E, Vastardis H. Delayed tooth eruption: pathogenesis, diagnosis, and treatment. A literature review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2004; 126(4): 432-45.
- Takehita EM, Iwama S, Silva TC, Dornelles RC, Delbem AC, Sasaki KT. Effect of fluoride and gonadal steroid deficiency on enamel and dentin mineralization of female rats. *J Appl Oral Sci*. 2004; 12(4): 326-9.
- Tang ZR, Zhang R, Lian ZX, Deng SL, Yu K. Estrogen-Receptor Expression and Function in Female Reproductive Disease. *Cells*. 2019; 8(10): E1123.
- Tetel MJ, Pfaff DW. Contributions of estrogen receptor-alpha and estrogen receptors to the regulation of behavior. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1800(10): 1084-9.
- Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone*. 1995; 17(4): 125S-133S.

Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS. Comparative anatomy and histology a mouse, rat, and human atlas. Second edition. India. Elsevier. 2018.

Tokavanich N, Gupta A, Nagata M, Takahashi A, Matsushita Y, Yatabe M, et al. A Three-dimensional analysis of primary failure of eruption in humans and mice. *Oral Dis.* 2019.

Um Lan C, Hsu CS, Yee R, Koh D, Lee YS, Chong MF, et al. Influence of metabolic-linked early life factors on the eruption timing of the first primary tooth. *Clin Oral Investig.* 2016; 20(8): 1871-1879.

van der Eerden BCJ, Emons J, Ahmed S, van Essen HW, Lowik CWGM, Wit JM, et al. Evidence for genomic and nongenomic actions of estrogen in growth plate regulation in female and male rats at the onset of sexual maturation. *J Endocrinol* 2002a; 175(2): 277–88.

Varlinskaya E, Vetter-O'Hagen, CS, Spear LP. Puberty and gonadal hormones: role in adolescent-typical behavioral alterations. *Horm Behav.* 2013; 64(2): 343–349.

Vasconcelos DFP, Vasconcelos ACCG. PTH intermittent administration may be a useful therapeutic agent to avoid premature eruption of the tooth. *Medical Hypothes.* 2016; 88: 27-29.

Verma N, Bansal A, Tyagi P, Jain A, Tiwari U, Gupta R. Eruption chronology in children: a cross-sectional study. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2017; 10(3): 278-282.

Vinel A, Coudert AE, Buscato M, Valera MC, Agnès O, Katzenellenbogen JA, et al. Respective role of membrane and nuclear estrogen receptor (ER) α in the mandible of growing mice: implications for ER α modulation. *J Bone Miner Res.* 2018; 33(8): 1520-1531.

Vucic S, Korevaar TIM, Dharmo B, Jaddoe VWV, Peeters RP, Wolvius EB, et al. Thyroid function during early life and dental development. *J Dent Res.* 2017; 96(9): 1020-1026.

- Wang CWJ, McCauley LK. Osteoporosis and Periodontitis. *Curr Osteoporos Rep.* 2016; 14(6): 284–291.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002; 420(6915): 520–62.
- Wayama MT, Yoshimura H, Ohba S, Yoshida H, Matsuda S, Kobayashi J, et al. Diminished progression of periapical lesions with soledronic acid in ovariectomized Rats. *J Endod.* 2015; 41(12): 2002-7.
- Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest.* 2006; 116(5): 1186-94.
- Wise GE. Cellular and molecular basis of tooth eruption. *Orthod Craniofac Res.* 2009; 12(2): 67-73.
- Wise GE, He H, Gutierrez DL, Ring S, Yao S. Requirement of alveolar bone formation for eruption of rat molars. *Eur J Oral Sci.* 2011; 119(5): 333-8.
- Wise GE, Fan W. Changes in the tartrate-resistant acid phosphatase cell population in dental follicles and bony crypts of rat molars during tooth eruption. *J Dent Res.* 1989; 68(2): 150-6.
- Wise GE, Frazier-Bowers S, D'Souza RN. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13(4): 323-34.
- Wise GE, King GJ. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2008; 87(5): 414-434.
- Wise GE, Yao S, Henk WG. Bone formation as a potential motive force of tooth eruption in the rat molar. *Clin Anat.* 2007; 20(6): 632-9.
- Wise GE, Yao S, Odgren PR, Pan F. CSF-1 regulation of osteoclastogenesis for tooth eruption. *J Dent Res.* 2005; 84(9): 837-41.

Wise GE, Yao S. Regional differences of expression of bone morphogenetic protein-2 and RANKL in the rat dental follicle. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114: 512–516.

Wu G, Xu R, Zhang P, Xiao T, Fu Y, Zhang Y, et al. Estrogen regulates stemness and senescence of bone marrow stromal cells to prevent osteoporosis via ER β -SATB2 pathway. *J Cell Physiol.* 2018; 233(5): 4194-4204.

Yao S, He H, Gutierrez DL, Rezai Rad M, Liu D, Li C, Flanagan M, Wise GE. Expression of bone morphogenetic protein-6 in dental follicle stem cells and its effect on osteogenic differentiation. *Cells Tissues Organs.* 2013; 198(6): 438-47.

Yen SSS, Tsai CC. The effect of ovariectomy on gonadotropin release. *J Clin Invest.* 1971; 50(5): 1149–1153.

Yoshida T, Wang J, Stern PH. Gonadal hormones and bone. *Handb Exp Pharmacol.* 2019.

Yilmaz B, Terekci H, Sandal S, Kelestimur F. Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Rev Endocr Metab Disord.* 2019.

Zhang B, Li Y, Zhou Q, Ding Y. Estrogen deficiency leads to impaired osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2011; 223(3): 177-86.

Zhou T, Pan J, Wu P, Huang R, Du W, Zhou Y, et al. Dental follicle cells: roles in development and beyond. *Stem Cells Int.* 2019; 2019: 9159605.

Zhu L, Brown WC, Cai Q, Krust A, Chambon P, Mc Guinness OP, et al. Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance. *Diabetes.* 2013; 62(2): 424-34.

Anexos

ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado "O papel do estrógeno e seus receptores na erupção dentária", Protocolo nº 2018.1.40.58.3, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Nelson Filho – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 18/04/2018.

Vigência do Projeto	01/06/2018 a 20/12/2020
Espécie/Linhagem	Rato heterogêneo / Wistar Hannover
Nº de animais	50
Peso/Idade	100g / 35 dias
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério Central – PUSP-RP

Ribeirão Preto, 18 de abril de 2018.

Prof. Dr. Michel Reis Messora

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

ANEXO B – PROTOCOLO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Comissão de Ética no Uso de Animais

Of. CEUA 040/2018

Ribeirão Preto, 18 de abril de 2018.

Ref. processo nº 2018.1.40.58.3

Senhor(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais, em sua 57ª Sessão, realizada em 18/04/2018, **APROVOU** os procedimentos éticos apresentados no Protocolo sobre a Pesquisa intitulada: "O papel do estrogênio e seus receptores na erupção dentária" emitindo o certificado anexo.

Salientamos que a Comissão sugere que, para a eutanásia, seja realizada decapitação após a administração de sobredose anestésica.

Informamos, também, que deverá ser entregue na Secretaria da CEUA, até **20/01/2021**, o **Relatório Final** contendo os resultados e/ou resumo do trabalho publicado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Michel Reis Messora

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Ilmo(a). Sr.(a)
Prof. Dr. Paulo Nelson Filho
Departamento de Clínica Infantil
desta Faculdade

/aafn

Apêndices

APÊNDICE A – REVISÃO LITERÁRIA SOBRE METODOLOGIA DE TAXA DE ERUPÇÃO DENTÁRIA

Artigo (Autor, ano)	Título do artigo	Objetivo principal	Parâmetros referenciais	Condição da função
Gerlach et al., 2000	The effect of lead on the eruption rates of incisor teeth in rats.	Avaliar o efeito do chumbo sobre os incisivos de ratos em erupção contínua	Grupo controle - Marca na superfície vestibular dos incisivos inferiores	Normofunção
			Grupo experimental - marca na superfície vestibular dos incisivos inferiores esquerdo	Normo-, hipo- e hiperfunção
Gerlach et al., 2002	Alveolar bone remodeling pattern of the rat incisor under different functional conditions as shown by minocycline administration	Avaliar a remodelação da região odontogênica de incisivos de ratos perante a administração da minoxiclina.	Grupo controle - Marca na superfície vestibular dos incisivos inferiores	Normofunção
			Grupo experimental - marca na superfície vestibular dos incisivos inferiores esquerdo	Normo-, hipo- e hiperfunção
Lee et al., 2002	A comparison between a conventional optical method and image-analysis for measuring the unimpeded eruption rate of the rat mandibular incisor	Comparar os métodos de análises de imagem para medir a taxa de erupção do incisivo inferior. O estudo também avaliou a borda incisal como ponto de referência para a medida da taxa de erupção sem erupção	Grupo controle - Marca na superfície vestibular dos incisivos inferiores	Normofunção
			Grupo experimental - marca na superfície vestibular dos incisivos inferiores esquerdo	Normo-, hipo- e hiperfunção
Sasaki et al., 2003	Neuroendocrine alterations impair enamel mineralization, tooth eruption and saliva in rat	Avaliar as repercussões de distúrbios hormonais sobre dentes e glândulas salivares.	Marca na superfície vestibular de todos os dentes a nível da papila interdental e ponto referência a nível do ponto mais baixo da gengiva	Normofunção
Shimada et al., 2006	Effects of local injections of vasoactive drugs on eruption rate of incisor teeth in anaesthetized rats	Avaliar os efeitos de injeções locais de drogas vasoativas no fluxo sanguíneo regional dentro da cavidade em associação erupção dentária.	Dispositivo de metal acoplado cirurgicamente no incisivo inferior	Normofunção
Drevensek et al., 2009	Orthodontic force decreases the eruption rate of rat incisors	Determinar se uma força de 25 cN aplicada aos dentes em direção anteroposterior reduz a erupção dentária de incisivos murinos	Marca na superfície vestibular de todos os dentes a nível da papila interdental e ponto referência a nível do ponto mais baixo da gengiva vestibular.	Normofunção
Omar et al., 2011	MT1-MMP expression in the odontogenic region of rat incisors undergoing interrupted eruption	Avaliar a expressão de MT1-MMP na região odontogênica, bem como a taxa de erupção e a morfologia do incisivo inferior esquerdo de ratos, sob interrupção da erupção dentária.	Marca na superfície vestibular de todos os dentes a nível da papila interdental e ponto referência a nível do ponto mais baixo da gengiva vestibular.	Normofunção
Gomes et al., 2013	Relationship between cell proliferation and eruption rate in the rat incisor	Avaliar a relação entre a proliferação celular e a taxa de erupção dentária no incisivo de ratos	Grupo controle - Marca na superfície vestibular dos incisivos inferiores	Normofunção
			Grupo experimental - marca na superfície vestibular dos incisivos inferiores	Hipo- e hiperfunção
Miwa et al., 2013	Effect of interrupted eruption on the enamel organ of the rat incisor.	Avaliar o comportamento dos tecidos incisivos de ratos durante a inibição da erupção dentária	Marca na superfície vestibular de todos os dentes a nível da papila interdental e ponto referência a nível do ponto mais baixo da gengiva	Normofunção

Artigo (Autor, ano)	Título do artigo	Objetivo principal	Parâmetros referenciais	Condição da função
Araújo et al., 2014	Effect of radiotherapy on the eruption rate and morphology of the odontogenic region of rat incisors.	Avaliar as alterações morfológicas causadas pela ação da radiação sobre a região odontogênica dos incisivos de ratos, com doses de 5 e 15Gy, e averiguar se essas alterações podem interferir na taxa de erupção desses dentes.	Marca na superfície vestibular de todos os dentes a nível da papila interdental e ponto referência a nível do ponto mais baixo da gengiva vestibular.	Normofunção
Silva et al., 2016	Parathyroid hormone intermittent administration promotes delay on rat incisor eruption	Avaliar a influência de paratireoide hormonal (PTH) na taxa de erupção dos incisivos inferiores	Grupo controle - Marca na superfície vestibular dos incisivos inferiores	Normofunção
			Grupo experimental - marca na superfície vestibular dos incisivos inferiores esquerdo	Normo-, hipo- e hiperfunção
Chidiac et al., 2019	Contribution of capsaicin-sensitive innervation to the continuous eruption of the rat mandibular incisors	Avaliar o papel dos aferentes sensíveis à capsaicina no processo de erupção de incisivos de ratos intactos	Marca na superfície vestibular de todos os dentes a nível da papila interdental e ponto referência em tatuagem metálica	Normofunção
Chidiac et al., 2018	Modulation of incisor eruption in rats by sympathetic efferents.	Reavaliar o papel da inervação simpática, através da observação dos efeitos da simpatectomia química ganglionar pré ou pós- erupção de incisivos de ratos intactos .	Marca na superfície vestibular de todos os dentes a nível da papila interdental e ponto referência em tatuagem metálica	Normofunção
Omar et al., 2018	Effects of loss of occlusal contact on the expression of matrix metalloproteinase-2, membrane type 1-MMP, tissue inhibitor of the MMP-2, eruption rate, organization and resistance of collagen fibers of the rat incisor periodontal ligament.	Avaliar o efeito da perda de contato oclusal, na expressão de metaloproteinase de matriz (MMP) -2, membrana tipo 1-MMP (MT1-MMP) e inibidor tecidual da MMP-2 (TIMP-2) em o ligamento periodontal do incisivo de rato , bem como a taxa de erupção, resistência e organização do colágeno.	Marca na superfície vestibular dos incisivos inferiores	Hipo- e hiperfunção