



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

NATAIRA REGINA MOMESSO

**Impacto da estropausa induzida
quimicamente ou por ovariectomia, associada ao uso do
ácido zoledrônico no reparo ósseo alveolar de
camundongos fêmeas C57Bl/6J**

**Araçatuba - SP
2023**

NATAIRA REGINA MOMESSO

**Impacto da- estropausa induzida
quimicamente ou por ovariectomia, associada ao uso do
ácido zoledrônico no reparo ósseo alveolar de
camundongos fêmeas C57Bl/6J**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (Unesp), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Orientadora: Prof^a. Assoc. Mariza Akemi Matsumoto

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Cristina Bigueti

Coorientador: Prof. Assoc. Edilson Ervolino

**Araçatuba - SP
2023**

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M732i Momesso, Nataira Regina.
Impacto da estropausa induzida químicamente ou por ovariectomia, associada ao uso do ácido zoledrônico no reparo ósseo alveolar de camundongos fêmeas C57BL/6J / Nataira Regina Momesso. - Araçatuba, 2023
50 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Mariza Akemi Matsumoto
Coorientadora: Profa. Claudia Cristina Biguetti
Coorientador: Prof. Edilson Ervolino

1. Osteonecrose da arcada osseodentária associada a difosfonatos 2. Ácido zoledrônico 3. Osteoporose 4. Difosfonatos 5. Menopausa I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

*Dedico este trabalho aos meus maiores incentivadores e amores,
aos meus pais, Magna Regina Valera Momesso e Evaristo Luiz Mo-
messo Junior, todos os méritos que alcancei foi graças a base e
apoio que eles me deram
Aos meus irmãos, Amanda Thaís Momesso Garcia e Evaristo Luiz
Momesso Neto, que me inspiram, ensinam e apoiam.
Não conseguiria sem vocês!*

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora por me guiarem e me fortalecerem durante toda a minha caminhada e escolhas.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara e do vice-diretor Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

À minha orientadora, Prof^a Mariza Akemi Matsumoto, que me inspira desde meu primeiro dia de graduação, me proporcionando muitas oportunidades as quais serei eternamente grata, obrigada por todo conhecimento transmitido, por toda paciência e todo amor que conduz a formação de todos ao seu redor.

À minha coorientadora, Prof^a Claudia Cristina Bigueti, minha grande inspiração e exemplo na área científica e na vida, que sempre com muita paciência e amor, executa tudo que lhe é proposto com mérito.

Ao meu coorientador, Prof. Edilson Ervolino, pela colaboração nos experimentos e por toda contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu eterno Prof e amigo de profissão, Paulo Domingos Ribeiro Junior, que me guia e direciona desde o primeiro momento que escolhi pela área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, meus sinceros agradecimentos por estar sempre presente, confiando e apoiando. Um grande exemplo de professor, pesquisador e profissional pelo qual tenho grande admiração.

Ao Prof Luís Eduardo Marques Padovan, meu querido professor e amigo de profissão, que sempre me orientou e me confiou trilhar a especialidade ao seu lado, gratidão e admiração.

Ao meu namorado Lucas Fracalossi, que está sempre apoiando meus sonhos e tornando a caminhada mais leve.

Aos amigos do grupo de pesquisa, pós-graduandos e alunos de iniciação científica, André Oliva, Ana Carolina Bacelar, Ana Júlia Moreno, Gustavo Simionato, Juliana Aguiar, Mariana Estochi, Samyra Dote, Carolyn Becher, Ramez Mahmoud, Danilo Masocatto, Raquel Parra e Kim Henderson, pela amizade construída e pelo trabalho em equipe para o desenvolvimento dos projetos de pesquisa. Vocês foram essenciais para o alcance de todos os objetivos.

À Carol Bacelar, um dos maiores presentes que a pós-graduação me deu, uma amiga-irmã, minha inspiração de dedicação e fé que tenho a honra e gratidão de caminhar ao lado nessa vida.

.À Carol Becher e Juliana Meira, minha gratidão por todo carinho e cuidado que sempre tiveram e tem comigo, meninas mulheres que me ensinaram que somos capazes de ser muito mais do que imaginamos, basta acreditar.

À Naara Monteiro, amiga que a pós e os plantões me deram, sempre me apoiando e tornando tudo mais leve na caminhada, gratidão por te-la como parte da minha história

À Profª Roberta Okamoto, por seu carinho com todos, sempre presente e disponível quando precisamos.

Ao Departamento de Ciências Básicas, professores e técnico-administrativos, pela convivência e pela possibilidade de execução dos experimentos laboratoriais.

Ao Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, por todos os ensinamentos ao longo das disciplinas, clínicas e plantões realizados ao longo do doutorado, através dos Professores: Francisley Ávila Souza, Leonardo Perez Faverani, Ana Paula Bassi, Idelmo Rangel Garcia Junior, Alessandra Aranega, Daniela Ponzoni e Osvaldo Magro Filho.

Ao Dr André Fabris e Dra Sabrina Ferreira por todos os ensinamentos transmitidos nos plantões.

Ao Departamento de Fisiologia pela disponibilização do biotério e laboratórios.

Ao Prof Rafael Ortiz, que apesar de pouco tempo de convivência, tenho grande admiração e carinho, pela humildade e atenção sempre para com todos.

Ao Profª Daniela Ponzoni, meu muito obrigada por aceitar fazer parte desse dia.

Ao Prof Celso Koogi Sonoda, meu muito obrigada por toda contribuição e colaboração sempre dentro da pesquisa.

Ao Paulo Henrique Costa Benedito, técnico do Sistema de Microtomografia Computadorizada de Alta Resolução da FOA/UNESP.

À agência de Fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela concessão de 18 meses de bolsa.

Muito obrigada a todos que me ajudaram e torceram para que essa fase da minha vida se concretizasse.

Acredite em si mesmo e tudo será possível.

Elvis Presley

MOMESSO, N. R. **Impacto da estropausa induzida quimicamente ou por ovariectomia, associada ao uso do ácido zoledrônico no reparo ósseo alveolar de camundongos fêmeas C57Bl/6J**. 2023. 50 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica caracterizada pela baixa densidade mineral e deterioração da microarquitetura óssea que acometem, predominantemente, indivíduos do sexo feminino decorrente da menopausa. Estudos em modelos animais auxiliam de maneira importante seu entendimento e as possíveis interferências que esta condição pode causar no processo de reparo ósseo, e para tanto, diversos métodos experimentais podem ser utilizados. O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar o impacto da condição de estropausa induzida quimicamente e por ovariectomia, associado ao uso do ácido zoledrônico (ZL) no reparo ósseo alveolar de camundongos. Para tanto, foram utilizadas 50 camundongos fêmeas C57Bl/6J de 4 e 6 meses, com aproximadamente 28 gramas. Os animais foram divididos em grupos, de acordo com o tratamento: CT – animais controle, sem tratamento (6 meses), OVX – submetidas a ovariectomia (4 meses), VCD – medicadas com diepóxido 4-vinilciclohexeno (4 meses) na dose de 160 mg/Kg/dia, via intra peritoneal (IP) por 20 dias consecutivos, CT+ZL – medicadas com ZL na dose de 500mg/Kg/semanal, via IP (6 meses), OVX+ZL – submetidas a ovariectomia e medicadas com ZL e VCD+ZL – medicadas com VCD e ZL. Constatada a condição de diestro persistente nos animais de todos os grupos, iniciou-se o tratamento com ZL quatro semanas antes da exodontia do incisivo superior direito, continuando até o final do experimento. O tratamento com VCD iniciou 115 dias antes da exodontia. Os períodos de análise foram estabelecidos em 7 e 21 dias pós-exodontia para análise dos alvéolos por meio de microtomografia computadorizada (microCT), histopatologia, birrefringência e imuno-histoquímica para marcadores OPG e TRAP. Os valores obtidos a partir das análises de microCT, PS, OPG e TRAP, foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e ANOVA, seguidos pelo teste de Dunn's, considerando-se $p < 0,05$. Aos 21 dias, os grupos tratados com ZL apresentaram aumento significativo de BV/TV quando comparados com seus pares sem tratamento. A análise histopatológica revelou processo de reparo sem intercorrências no grupo CT, assim como no grupo OVX, destacando-se a presença de trabé-

culas delgadas e pouco celularizadas aos 21 dias. Os alvéolos do grupo VCD mostraram trabéculas ósseas imaturas e irregulares, com focos de coágulo aos 7 dias; porém, aos 21 dias as trabéculas se mostravam maduras e regulares. O ZL melhorou a qualidade óssea ao final do reparo nos grupos CT e OVX. No entanto, no grupo VCD, o ZL parece ter interferido de modo mais importante, sendo possível observar atividade osteogênica e focos de infiltrado inflamatório aos 21 dias. A análise de birrefringência revelou aumento significativo de fibras colágenas vermelhas no grupo CT+ZL quando comparado com VCD+ZL aos 21 dias. Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos considerando-se as imuno-marcações para TRAP e OPG. A partir destes resultados, pode-se concluir que no presente modelo, a FOP induzida por OVX e VCD não impedem a reparação óssea alveolar, apesar de interferirem na qualidade trabecular. Entretanto, nos animais submetidos à FOP por VCD interferiu de modo importante, atrasando o processo de reparo ósseo intra-alveolar.

Palavras-chave: Osteonecrose da arcada osseodentária associada a difosfonatos. Ácido zoledrônico. Osteoporose. Difosfonatos. Menopausa.

MOMESSO, N. R. **Impact of chemically or ovariectomically induced menopause associated with zoledronic acid on bone dental socket repair in C57Bl/6J female mice**. 2023. 50 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

Osteoporosis is a systemic skeletal disease characterized by low mineral and motor density of the bone microarchitecture that predominantly affects female individuals due to menopause. Studies in animal models help in an important way to understand and the possible interference that this condition can cause in the bone repair process, and for that, several experimental methods can be used. The objective of the present study was to evaluate the impact of chemically and ovariectomy-induced estropause associated with the use of zoledronic acid (ZL) on alveolar bone repair in mice. For this purpose, 50 female C57Bl/6J mice aged 4 and 6 months, weighing approximately 28 grams, were used. The animals were divided into groups, according to the treatment: CT – control animals, without treatment (6 months), OVX – maintained with ovariectomy (4 months), VCD – medicated with 4-vinylcyclohexene diepoxide (4 months) at a dose of 160 mg/Kg/day, intraperitoneally (IP) for 20 consecutive days, CT+ZL – medicated with ZL at a dose of 500mg/Kg/week, via IP (6 months), OVX+ZL – mandatory for ovariectomy and medicated with ZL and VCD+ZL – drugs with VCD and ZL. Once the condition of persistent diestrus was verified in the animals of all groups, treatment with ZL was started four weeks before the extraction of the upper right incisor, continuing until the end of the experiment. Treatment with VCD started 115 days before tooth extraction. The analysis periods lasted 7 and 21 days post-extraction for analysis of the sockets by means of computed microtomography (microCT), histopathology, birefringence and immunohistochemistry for OPG and TRAP markers. The values obtained from the microCT, PS, OPG and TRAP analyses, were approved by the Shapiro-Wilk and ANOVA tests, followed by the Dunn's test, considering $p < 0.05$. At 21 days, the ZL-treated groups demonstrated a significant increase in BV/TV when compared to their untreated peers. Histopathological analysis revealed an uneventful repair process in the CT group, as well as in the OVX group, highlighting the presence of thin and poorly cellularized trabeculae at 21 days. The sockets in the VCD group had immature and irregular bone trabeculas, with clot foci at 7 days; however, at 21 days the trabeculae were mature and regular. ZL improved bone quality at the end of

repair in the CT and OVX groups. However, in the VCD group, ZL seems to have interfered more significantly, with osteogenic activity and foci of inflammatory infiltrate being possible to observe at 21 days. An ascending birefringence analysis revealed a significant number of red collagen fibers in the CT+ZL group when compared to the VCD+ZL group at 21 days. No differences were identified between the groups considering the immunostaining for TRAP and OPG. Based on these results, it can be concluded that in the present model, FOP induced by OVX and VCD does not impede alveolar bone defense, despite interfering with trabecular quality. However, in animals treated with FOP, VCD interfered significantly, delaying the process of intra-alveolar bone repair.

Keywords: Bisphosphonate Associated Osteonecrosis. Zoledronic acid. Osteoporosis. Diphosphonates. Menopause.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Linha do tempo referente aos procedimentos que foram realizados nos grupos CT, OVX, VCD, CT+ZL, OVX+ZL e VCD+ZL.....	25
Figura 2 -	Resultados estatísticos referentes às análises microtomográficas dos alvéolos pós extração. Os (*) representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Letras diferentes representa, diferença estatística significativa entre os períodos dos mesmos grupos. A normalidade dos resultados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk. A análise estatística realizada utilizando-se os testes ANOVA seguido de Tukey, considerando $p < 0,05$	31
Figura 3 -	Representação microtomográfica bidimensional dos alvéolos pós extração dos animais CT, OVX e VCD, tratados ou não com ZL. Imagens são apresentadas no sentido transaxial. Imagens obtidas pelo Software Data Viewer, Bruker (Skycan, Kontich, Belgium).....	32
Figura 4 -	Aspectos histopatológicos dos alvéolos em reparação aos 7 e 21 dias, dos grupos CT, OVX, VCD, CT+ZL, OVX+ZL e VCD+ZL (HE, aumento original 10x).....	35
Figura 5 -	Resultados estatísticos referentes às análises do Picrosirius-Red dos alvéolos pós extração. A) Quantifica a área verde de fibras de colágeno. B) Quantifica a área de fibras vermelhas de colágeno. C) Quantifica a área total de fibras de colágeno. Os (*) representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A normalidade dos resultados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk. A análise estatística realizada utilizando-se os testes ANOVA seguido de Tukey, considerando $p < 0,05$	36
Figura 6 -	Análise de birrefringência por Picrosirius-Red e quantificação das fibras de colágeno na região dos alvéolos nos períodos de 7 e 21 dias (aumentos original 10x).....	37

Figura 7 - Resultados estatísticos referentes às análises da imunomarcacão para TRAP dos alvéolos pós extração. A normalidade dos resultados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk. A análise estatística realizada utilizando-se os testes ANOVA seguido de Tukey, considerando $p < 0,05$	38
Figura 8 - Imunomarcacão para TRAP nas células osteoclásticas na região dos alvéolos nos períodos de 7 e 21 dias (aumento original 20x obtida pelo Software Aperio ImageScope – v12.4.6.5003).....	38
Figura 9 - Resultados estatísticos referentes às análises da imunomarcacão para OPG dos alvéolos pós extração. A normalidade dos resultados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk. A análise estatística realizada utilizando-se os testes ANOVA seguido de Tukey, considerando $p < 0,05$	39
Figura 10 Imunomarcacão para OPG nas células osteoblásticas na região dos alvéolos nos períodos de 7 e 21 dias (aumento original 20x obtida pelo Software Aperio ImageScope – v12.4.6.5003).....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição por idade e quantidade de animais nos grupos CT, OVX, VCD, CT+ZL, OVX+ZL e VCD+ZL, no início do experimento.....	22
Tabela 2 - Média e desvio-padrão obtidos a partir das análises microtomográficas dos alvéolos pós extração. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Normalidade dos resultados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk. A análise estatística realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.....	32
Tabela 3 - Aspectos histopatológicos dos alvéolos pós exodontia dos grupos CT, OVX, VCD, CT+ZL, OVX+ZL e VCD+ZL aos 7 e 21 dias.....	34
Tabela 4 - Média e desvio-padrão obtidos a partir das análises de birrefringência dos alvéolos pós extração. Os (*) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Normalidade dos resultados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk. A análise estatística realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.....	37
Tabela 5 - Média e desvio-padrão obtidos a partir das análises de imunomarcção TRAP e OPG dos alvéolos pós extração. A normalidade dos resultados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk. A análise estatística realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.....	40

LISTA DE SIGLAS

BPns	Bisfosfonatos nitrogenados
BV/TV%	Percentual de Volume Ósseo
CT	Controle
DMO	Baixa Densidade Mineral Óssea
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
HE	Hematoxilina e Eosina
ICSD	Incisivo Central Superior Direito
IP	Intraperitoneal
MicroCT	Microtomográfico
OMAMs	Osteonecrose dos Maxilares Relacionada ao uso de Medicamentos
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPG	Osteoprotegerina
OVX	Ovariectomia
PS	Picrosirius-Red
PVPI	Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante
ROI	Região de Interesse
Tb.N	Número de Trabéculas
Tb.Sp	Separação de Trabéculas
Tb.Th	Espessura de Trabéculas
TRAP	Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato
VCD	Diepóxido de 4-vinilciclohexeno
ZL	Ácido Zoledrônico
FOP	Falência Ovariana Prematura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	15
2 OBJETIVOS	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Aspectos Éticos	21
3.2 Modelo Experimental	21
3.3 Delineamento Experimental	21
3.4 Tratamento Farmacológico com VCD	22
3.5 Procedimento Cirúrgico para OVX	22
3.6 Avaliação da Citologia Vagina Diária	23
3.7 Tratamento Farmacológico com ZL	24
3.8 Procedimento Cirúrgico para Exodontia	24
3.9 Eutanásia dos Animais e Coleta dos Espécimes	26
3.10 Análise MicroCT	26
3.11 Procedimentos Histotécnicos	27
3.12 Análise Histopatológica	27
3.13 Análise de Birrefringência em Picrosirius-Red	28
3.14 Técnica Imuno-histoquímica	28
3.14.1 Análise Imuno-histoquímica	29
3.15 Análise Bioestatística	29
4 RESULTADOS	31
4.1 Análise MicroCT	31
4.2 Análise Histopatológica	33
4.3 Análise de Birrefringência em Picrosirius-Red	35
4.4 Análise Imuno-histoquímica	37
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXOS	50

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Segundo um consenso realizado pela Fundação Europeia de Osteoporose e Doença Óssea, em 1993, a osteoporose é uma doença esquelética sistêmica caracterizada pela baixa densidade mineral óssea (DMO) e a deterioração da microarquitetura óssea, acometendo principalmente mulheres na fase entre a terceira e quarta década de vida e/ou na fase pós-menopausa, de modo que tal condição aumenta o risco de fraturas ósseas devido a fragilidade existente (ARCEO-MENDOZA; CAMACHO, 2015, 2021; BHATNAGAR; KEKATPURE, 2022; EASTELL *et al.*, 2016; OSTEOPOROSIS, 1993). Os sítios mais comuns de tais fraturas são quadril, coluna vertebral e punho, o que gera alta morbidade, além de que outros ossos podem ser acometidos (EASTELL *et al.*, 2016; STONE *et al.*, 2003). Neste sentido, devido ao aumento da expectativa de vida, a incidência de fraturas ocasionadas por essa doença tem aumentado consideravelmente ao longo dos anos, se tornando desse modo um problema de saúde pública por estarem relacionadas ao aumento de morbidade, mortalidade e altos custos socioeconômicos (BACCARO *et al.*, 2015; BHATNAGAR; KEKATPURE, 2022; SCHUIT *et al.*, 2004).

A Fundação Nacional de Osteoporose, estima que até 2030, o número de de adultos com osteoporose e baixa massa óssea aumentará para 71 milhões (ARCEO MENDOZA; CAMACHO, 2021; WRIGHT *et al.*, 2008).

Em 1994, a Organização Mundial de Saúde (OMS), idealizou critérios de diagnóstico utilizando escores de desvio padrão da DMO, utilizando como controles mulheres jovens saudáveis em comparação a pacientes com osteoporose, sendo definida uma numeração padrão de 2,5 ou menos para DMO, correlacionando-se tal parâmetro com a patogenia das fraturas e fragilidade óssea (BHATNAGAR; KEKATPURE, 2022; COMPSTON; MCCLUNG; LESLIE, 2019). Porém, em estudos realizados por Schuit *et al.* (2004) e Siris *et al.* (2015), a DMO isoladamente é limitada como indicador clínico de osteoporose, sendo considerada como um dos vários fatores de risco para fraturas, já que existem relatos de fraturas por fragilidade em indivíduos com valores DMO acima desse limiar (ARCEO-MENDOZA; CAMACHO, 2021; KANIS, 2002; KANIS *et al.*, 2019; SCHUIT *et al.*, 2004; SIRIS *et al.*, 2015).

Embora seja considerado um problema de saúde pública, o diagnóstico dessa doença ocorre muitas vezes após o primeiro episódio de fratura, já que os pacientes

não apresentam sintomatologia (UNNANUNTANA *et al.*, 2010) e a prevenção antecipada ainda é deficiente (RACHNER; KHOSLA; HOFBAUER, 2011). Entretanto, há um grande interesse por parte da sociedade médica e científica sobre métodos de tratamento e prevenção, já que ainda existem métodos totalmente eficazes e seguros para o tratamento após a primeira ocorrência de fratura (CONSENSUS, 1993; MANAGEMENT OF OSTEOPOROSIS IN POSTMENOPAUSAL WOMEN, 2021; UNNANUNTANA *et al.*, 2010). Dessa forma o objetivo da avaliação clínica do paciente é identificar aqueles que estão em risco de fratura osteoporótica, sendo os principais fatores de risco relacionados a: histórico familiar de fratura por fragilidade em parentes de primeiro grau (principalmente materna), baixo peso corporal (BHATNAGAR; KEKATPURE, 2022; UNNANUNTANA *et al.*, 2010), hipertireoidismo prévio, tabagismo, álcool, uso de corticoterapia e benzodiazepínicos, independentes, deficiência nutricionais, como, de vitaminas (D, B12 e K) e cálcio e sedentarismo (BHATNAGAR; KEKATPURE, 2022; CONSENSUS, 1993; KANIS *et al.*, 2019; UNNANUNTANA *et al.*, 2010).

Neste sentido, além de modificações no estilo de vida (aumento de atividade física, redução no consumo de álcool e suspensão do tabagismo), os pacientes que apresentam-se em risco de fraturas são orientados a realizarem suplementação de vitamina D e cálcio (RACHNER; KHOSLA; HOFBAUER, 2011), a fim de minimizar perda óssea. Entretanto, tais medidas não restauram a DMO e não podem ser consideradas terapias suficientes para pacientes com alto risco de fratura (COMPSTON; MCCLUNG; LESLIE, 2019). Desse modo, intervenções farmacológicas mais radicais como o uso de inibidores reabsortivos são altamente indicadas para tais pacientes.

Os bisfosfonatos nitrogenados (BPns) são uma classe de medicamentos anti-reabsortivos classicamente indicados para o tratamento de osteoporose, podendo variar na sua potência e via de administração, tais como alendronato de sódio e risedronato, ambos administrados por via oral, ou melhor desempenho, o ácido zolendrônico, administrado por via intravenosa nos casos de osteoporose severa (COMPSTON, J *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2023). De fato, o uso de BPns é associado com a redução de fraturas em acompanhamentos por até 5 anos de tratamento, porém existem poucos dados na literatura além desse período (ARCEO-MENDOZA; CAMACHO, 2021; COMPSTON; MCCLUNG; LESLIE, 2019; FREEMANTLE *et al.*, 2013).

De forma importante, sabe-se que os BPns são mantidos no osso por algum tempo após cessar seu uso e continuam a ter efeitos benéficos por períodos variados,

dependendo da escolha (COMPSTON; MCCLUNG; LESLIE, 2019). As recomendações de tratamento são de 5 anos para os BPns orais e de 3 anos para os intravenosos (COMPSTON, J *et al.*, 2017; KANIS *et al.*, 2019; MILLER *et al.*, 2002; REGINSTER; RABENDA, 2006), sendo que após esse período se DMO estiver estável e não apresentar riscos de queda ou fraturas durante o período de tratamento, a droga poderá então ser interrompida (COMPSTON; MCCLUNG; LESLIE, 2019). Como o ácido zoledrônico (ZL) se mostra mais efetivo que os outros bisfosfonatos (BERENSON *et al.*, 2001) e altamente eficaz para a osteoporose pós-menopausa grave em mulheres idosas (VAN POZNAK *et al.*, 2011), é então considerado de primeira escolha para o tratamento (HAMDY, 2010).

Enquanto o uso de BPns parece ter efeitos benéficos sobre esqueleto sistemicamente, seus efeitos colaterais nos ossos maxilares podem também levar a importantes comorbidades aos pacientes que fazem uso crônico deste medicamento. As Osteonecroses dos Maxilares relacionada ao uso de Medicamentos (OMAMs) principalmente relacionadas ao uso dessa classe de medicamentos antirreabsortivos, com exceção do tratamento prévio com radiação (BIGUETTI *et al.*, 2019; GUPTA; GUPTA, 2022; HOEFERT *et al.*, 2015; KANIS *et al.*, 2019; KOZUTSUMI *et al.*, 2022; MARTINS *et al.*, 2023; RUGGIERO *et al.*, 2014).

O risco de OMAMs ocasionado pelo uso de BPns em pacientes com osteoporose ser estimado em 0,0001% a 0,01% marginalmente superior à incidência na população geral (<0,001%) (KHAN *et al.*, 2014), eles não estão isentos do aparecimento da doença quando submetidos a procedimentos odontológicos invasivos como extrações dentárias (KHAN *et al.*, 2017). Além disso, tais dados epidemiológicos ainda continuam em evolução, uma vez que as OMAMs consistem em uma classe de patologias clínicas ainda pouco diagnosticada fora dos ambientes acadêmicos. Acredita-se que com o uso dessas medicações, a resposta inflamatória inicial no local cirúrgico torna-se comprometida, afetando a capacidade de resposta, bem como o reparo adequado do tecido ósseo (HOEFERT *et al.*, 2015).

Diante deste quadro, há um crescente interesse na comunidade científica sobre o entendimento dos mecanismos relacionados ao desenvolvimento das OMAMs. Para tanto, modelos com murinos tem sido amplamente utilizado, principalmente camundongos, uma vez que apresentam maior homogeneidade nas análises intra grupo por serem em sua maior partes consanguíneos e possuírem resposta mais homogênea,

serem de fácil manipulação, além de requerer uma quantidade reduzida das drogas e reagentes (BIGUETTI *et al.*, 2019). Segundo uma revisão recente desenvolvida pelo nosso grupo, camundongos C57BL/6 são os mais utilizados para a indução das OMAMs experimentais, notasse assim uma escassez na literatura com esses modelos animais, que representam a epidemiologia das OMAMs em mulher idosas, menopausadas (BIGUETTI *et al.*, 2019).

É importante destacar que a maioria dos trabalhos experimentais em OMAM em camundongos são realizados em animais adultos jovens e machos, excluindo importantes variáveis experimentais presente na clínica: condição de menopausa, senescência e sexo feminino. Assim, torna-se oportuna a análise do desenvolvimento experimental das OMAMs frente à condição de osteoporose pós-menopausa. Neste contexto, nosso grupo tem desenvolvido diferentes trabalhos comparando-se as OMAMs em fêmeas senescentes, já na fase pós-menopausa. Entretanto, não se sabe se o processo de senescência por si já configura uma variável suficiente para o agravamento de tal condição. Torna-se claro, que o isolamento dessas várias (sexo, idade, comorbidades) em condições experimentais são de fundamental importância para o entendimento dessa patologia.

A osteoporose experimental em murinos tem sido classicamente realizada por meio de um procedimento cirúrgico que envolve a remoção dos ovários (ovariectomia). A ovariectomia (OVX), ou remoção cirúrgica dos ovários, é conhecida como padrão-ouro para avaliar os efeitos do hormônio gonadal em modelos animais (KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016). O procedimento padrão é a excisão bilateral dos ovários (trompas de falópio) e pontas do corno uterino da cavidade peritoneal (OLSON; BRUCE, 1986), considerada o modelo ideal para avaliar os efeitos específicos da privação do hormônio e os tratamentos hormonais exógenos e na periferia do cérebro em modelos experimentais (KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016). Apesar dessas possibilidades, vale ressaltar que a principal desvantagem desse modelo é que não reproduz a menopausa fisiológica que ocorre para a maioria das mulheres. Durante a menopausa, ocorre a atrofia do ovário, porém o mesmo continua a liberar hormônios andrógenos e baixos níveis de esteroides (KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016). Além de que já é descrito na literatura que para a OVX induzir a osteoporose com maior precisão é necessário combinar ela com uma dieta pobre em cálcio

(RAMALHO-FERREIRA *et al.*, 2016; TEÓFILO; BRENTGANI; LAMANO-CARVALHO, 2004).

Entretanto, uma outra alternativa interessante consiste na indução a atrofia do ovário por meio de uma droga citotóxica, denominada diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) (BRINTON, 2014). O VCD foi inicialmente desenvolvido para reduzir a fecundidade e a proliferação das espécies de pragas de roedores sem uso de venenos que colocam em risco o meio ambiente (DYER *et al.*, 2013). Como o VCD causa um esgotamento seletivo dos folículos ovarianos, que não são renováveis, o seu tratamento com essa droga se torna irreversível (MAYER *et al.*, 2004). Este modelo permite uma transição da menopausa mais semelhante à condição de menopausa humana se comparado ao modelo de OVX, já que neste caso se mantêm os órgãos reprodutivos da fêmea no estágio pós-reprodutivo da vida, ou seja, o folículo ovariano e perfil hormonal esteroide circulante se assemelham a maioria das mulheres em fase de transição (KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016). A desvantagem apresentada está no estresse gerado ao animal durante a aplicação da droga, diminuindo peso corporal, mas geralmente retornam aos pesos basais após a administração da medicação (KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016).

Diante do atual contexto e dessas interessantes alternativas experimentais, acredita-se que tais modelos possam auxiliar no entendimento da influência da variável menopausa, sem a interferência do processo de senescência, sobre o desenvolvimento da OMAM relacionada ao uso de ZL. De fato, ainda não existem trabalhos que mostram a qualidade do reparo ósseo em paciente na menopausa ou portadores de osteoporose, fazendo uso do ZL, de modo que acreditamos ser de grande valia para a qualidade de vida de pacientes que iniciam essa fase.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o impacto da condição de estropausa induzida quimicamente ou por OVX, associado ao uso do ZL no reparo ósseo alveolar de camundongos C57BL/6J.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus Araçatuba, protocolo n° 00910-2019 (Anexo A).

3.2 Modelo Experimental

Foram utilizados 52 camundongos da linhagem C57BL/6J, com idades de 4 e 6 meses e peso variando entre 28 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto (USP – Ribeirão Preto/SP) e mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA-UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, com até cinco animais em cada gaiola, forradas com maravalha branca de pinho trocada duas vezes por semana. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram no biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba –FOA-UNESP, sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, recebendo água a vontade e ração sólida sem restrição. Foram seguidas as recomendações do guia ARRIVE (KILKENNY *et al.*, 2010).

3.3 Delineamento Experimental

Os camundongos foram distribuídos em 6 grupos, de acordo com o tratamento: Controle (CT) – sem tratamento, OVX – ovariectomizadas (SOUZA *et al.*, 2019), VCD - 160mg/Kg/dia de VCD via intraperitoneal (IP) durante 20 dias (KOEBELE; BIMONTENELSON, 2016; WRIGHT *et al.*, 2008), CT+ZL - 500ug/Kg de ZL uma vez por semana via IP, OVX+ZL – 500ug/Kg de ZL via IP uma vez por semana, VCD+ZL - 160mg/Kg/dia de VCD via IP durante 20 dias e 500ug/Kg de ZL via IP uma vez por semana. Após 20 dias da OVX e 52 dias do final do tratamento com VCD, realizou-se a análise do ciclo estral por 10 dias, a fim de se confirmar a condição de diestro permanente. Após este período, nos grupos CT+ZL, OVX+ZL e VCD+ZL, iniciou-se o tratamento com ZL durante 4 semanas, e após a extração dentária, que ocorreu na 5ª

semana de aplicação do ZL, foram mantidas as aplicações até o momento das eutanásias (7 e 21 dias, pós exodontia). No grupo CT+ZL, os animais receberam a medicação, após 10 dias do início da citologia vaginal ao início do experimento. A distribuição dos animais de acordo com a idade e a quantidade (n) por grupo, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição por idade e quantidade de animais nos grupos CT, OVX, VCD, CT+ZL, OVX+ZL e VCD+ZL, no início do experimento

Grupos/tratamentos	CT	OVX	VCD	CT+ZL	OVX+ZL	VCD+ZL
7 dias pós exodontia	6 meses n = 3	4 meses n = 5	4 meses n = 5	6 meses n = 3	4 meses n = 5	4 meses n = 5
21 dias pós exodontia	6 meses n = 3	4 meses n = 5	4 meses n = 5	6 meses n = 3	4 meses n = 5	4 meses n = 5

CT – Controle; OVX – ovariectomizadas; VCD – tratadas com VCD; CT+ZL- tratadas com ZL; OVX+ZL – ovariectomizadas e tratadas com ZL e VCD+ZL – tratadas com VCD e ZL.

Fonte: Autor, 2023

3.4 Tratamento Farmacológico com VCD

Os camundongos fêmeas na idade de 04 meses dos grupos VCD e VCD+ZL foram tratadas com injeções IP 160mg/Kg de 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) obtido do laboratório Sigma-Aldrich (#S453005), durante 20 dias, seguindo protocolo previamente estabelecido (KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016; WRIGHT *et al.*, 2008). Após 32 dias da última dose da medicação, iniciou-se avaliação diária da citologia vaginal, após 10 dias de diestro persistente, concluiu-se que a insuficiência ovariana foi atingida (BROOKS; FOLLOW; HOYER, 2016; LOHFF *et al.*, 2006).

3.5 Procedimento Cirúrgico Para OVX

Com 4 meses de idade, os animais do grupo OVX foram pesados em balança digital imediatamente antes de qualquer procedimento cirúrgico, para quantificação correta da dosagem das drogas. Os animais foram submetidos à sedação por meio de injeção IP do anestésico Ketamina a 1% com dose de 50 mg/kg (Francotar®, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil) associado ao relaxante muscular Cloridrato de Xilazina a 2% com dose de 5 mg/kg (Virbaxyl 2%®, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil). Em seguida, foi

realizada tricotomia unilateral à coluna lombar, e antissepsia da região a ser incisada com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%®, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil), associado ao PVPI tópico. A técnica de escolha para a cirurgia seguiu o protocolo estabelecido na literatura atual (SOUZA *et al.*, 2019). O animal foi colocado na mesa operatória com as costas expostas e a cauda voltada para o operador. A incisão de aproximadamente 0,5 cm foi realizada na área abdominal dorsolateral entre a última costela e quadril (SOUZA *et al.*, 2019). A musculatura foi divulsionada usando uma tesoura de ponta romba curva. Após localizar o ovário, a almofada de gordura ovariana foi cuidadosamente tracionada para fora da incisão, de modo a expor o oviduto com o auxílio de uma pinça hemostática. Com o auxílio de um fio de sutura estéril, foram realizados dois nós para delimitar a área a ser removida e para evitar sangramentos após remoção do ovário. O ovário foi removido cortando cuidadosamente o oviduto, usando uma tesoura pequena. O útero e o restante do oviduto foram recolocados na cavidade abdominal. Foi então realizada uma sutura simples com fio não absorvível de nylon 5.0 (Shalon, Shalon Fios Cirúrgicos LTDA, São Luís de Montes Belos – GO, Brasil). Os animais foram mantidos em caixas individuais e em observação por aproximadamente 2 a 4 horas, até que se recuperassem totalmente da anestesia. Após 24 horas da cirurgia (período de recuperação) os animais foram recolocados nas caixas que ocupavam. Nenhuma restrição alimentar ou de movimentação foi imposta aos animais.

3.6 Avaliação da Citologia Vaginal Diária

Para coleta do lavado vaginal e posterior análise citológica do conteúdo, utilizou-se uma pipeta automática coletou-se 50µl de solução salina estéril. Cada uma das camundongos foi segurada pela cauda, garantindo que as patas traseiras estivessem suspensas. A ponteira foi colocada delicadamente na abertura do canal vaginal, aproximadamente 1-2mm de profundidade (CORA; KOOISTRA; TRAVLOS, 2015). Os 50µl foram expelidos e o líquido foi espontaneamente aspirado para dentro do canal. Após, liberou-se lentamente a pressão exercida sobre a pipeta para que o fluido retornasse à ponteira. É necessário expelir e aspirar o líquido de 2-3 vezes para garantir um número de células suficientes na amostra. O líquido foi colocado sobre a lâmina de vidro. Após secar em temperatura ambiente, recebeu o corante azul de toluidina

durante 1 minuto. Posteriormente, foi feita lavagem em água destilada por 1 minuto e deixado para secar em temperatura ambiente. Utilizando-se um microscópio de luz, foram determinados os tipos e proporções de células presentes que permitissem identificar em qual fase do ciclo estral o animal se encontrava. Considerou-se a fase diestro quando houvesse predomínio de neutrófilos, algumas células epiteliais nucleadas e raras células epiteliais escamosas cornificadas (CORA; KOOISTRA; TRAVLOS, 2015; MCLEAN *et al.*, 2012).

3.7 Tratamento Farmacológico com ZL

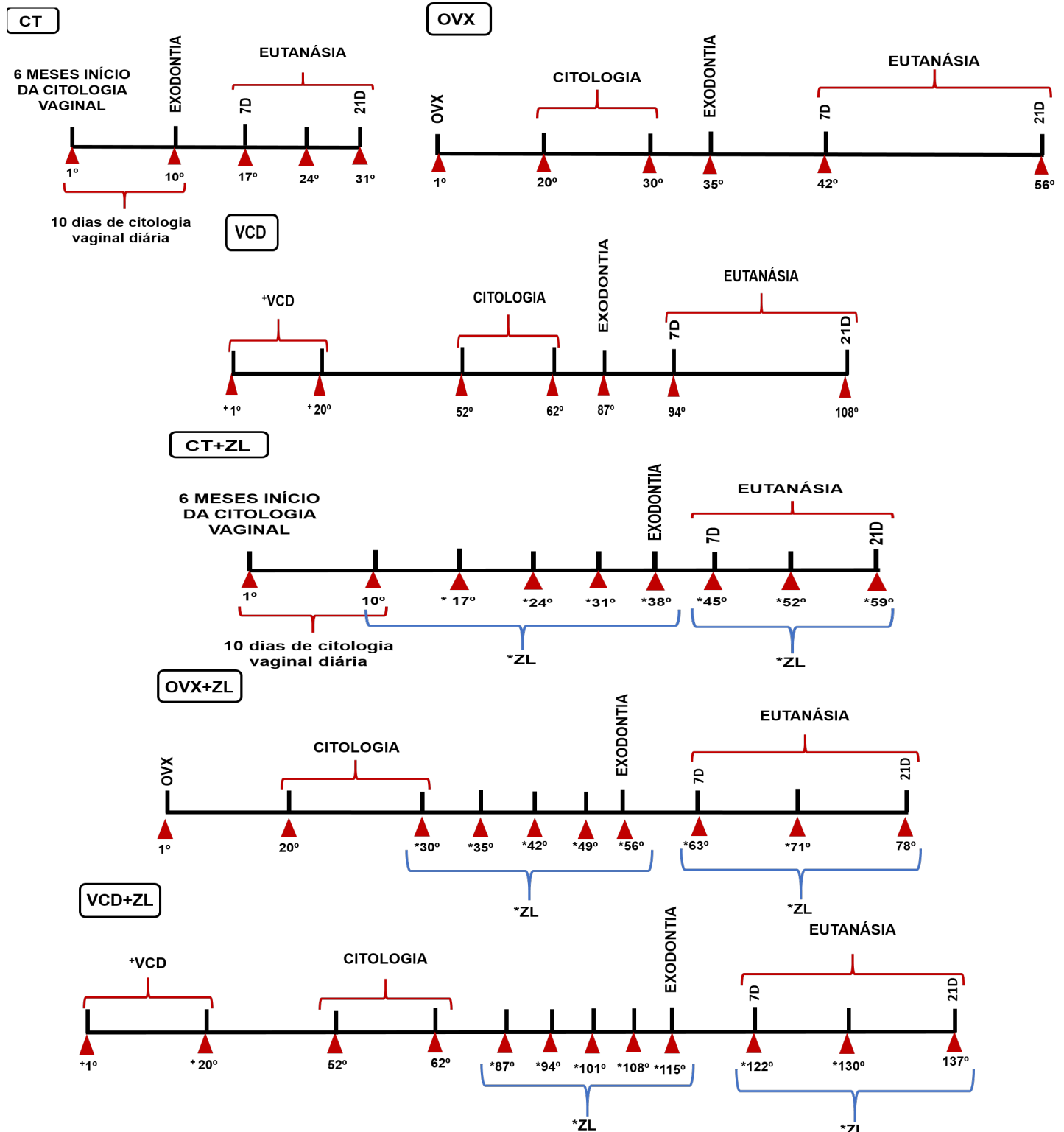
Para tratamento com ZL foi utilizado a formulação laboratorial da Sigma-Aldrich (#SML0223) diluído em solução fisiológica estéril (SF 0,9%), administrado na dosagem de 500ug/Kg/semana, via IP, durante 4 semanas antes da exodontia do incisivo central superior direito (ICSD) e até o final dos períodos experimentais (7 e 21 dias). A dose utilizada já apresenta estudo piloto com resultados satisfatórios para a linhaagem de escolha (BIGUETTI *et al.*, 2019).

3.8 Procedimento Cirúrgico para Exodontia

As exodontias nos grupos que não realizaram a aplicação do ZL, seguiram da seguinte forma: CT – 10º dia, OVX – 35º dia e VCD – 87º, contando a partir do início da citologia vaginal. Já os animais que receberam o ZL, as exodontias ocorreram após 28 dias do início da citologia vaginal, no grupo CT+ZL, o grupo OVX+ZL 56 dias após a OVX e o grupo VCD+ZL 115 dias após a primeira dose do VCD. Os animais foram submetidos a sedação por meio de injeção IP do anestésico Ketamina a 1% com dose de 50mg/Kg (Francotar®, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil) associado ao sedativo Clo-ridrato de Xilazina a 2% com dose de 5 mg/kg (Virbaxyl 2%®, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil). Constatada a sedação profunda dos animais, foi realizada uma incisão sulcular ao redor do ICSD com micro lâmina de bisturi (Fine Science Tools®). Em ato contínuo, foi realizado divulsão da mucosa inserida com auxílio de uma sonda exploradora adaptada, conforme previamente descrito, a mesma utilizada para luxação e extração propriamente dita (BIGUETTI *et al.*, 2019). Posteriormente, o alvéolo foi irrigado com soro fisiológico 0,9% estéril.

O desenho do modelo experimental pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 – Linha do tempo referente aos procedimentos que foram realizados nos grupos CT, OVX, VCD, CT+ZL, OVX+ZL e VCD+ZL.



+ injeções intraperitoneais diárias 160mg/Kg de 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) seguindo protocolo previamente estabelecido por Liu et al., 2015.

*aplicação de ZL 500ug/Kg/semana, via IP, durante 4 semanas antes da exodontia do incisivo superior direito e até o final dos períodos experimentais (Biguetti et al., 2019).

3.9 Eutanásia dos Animais e Coleta dos Espécimes

As eutanásias ocorreram nos períodos de 7 e 21 dias pós-exodontia, por meio sobredosagem do anestésico cloridrato de quetamina (250mg/Kg) via IP, seguido de deslocamento cervical, seguindo-se as normas vigentes pelo CONCEA (Conselho Nacional de Experimentação Animal). Constatada a morte dos animais, as maxilas foram imersas em frascos individuais contendo formalina a 10% tamponada, lavados em água corrente após 48 horas do processo de fixação, e acondicionados em álcool 70, para o escaneamento microtomográfico (MicroCT). Após o escaneamento as peças foram lavadas e imersas em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10% para desmineralização e posterior emblocamento em parafina.

3.10 Análises MicroCT

Espécimes ósseos acondicionados em álcool 70 v/v foram escaneados em equipamento de microCT (SkyScan 1174v2, Bruker MicroCT, Kontich, Bélgica), da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP, para posteriores análises quantitativa e qualitativa do tecido ósseo (BOUXSEIN *et al.*, 2010).

O escaneamento das maxilas, foi realizado com tempo de aquisição de 28 minutos, utilizando-se os seguintes parâmetros tomográficos: 70kV, 142 uA, com filtro de Al de 0.5mm, sendo as imagens capturadas um tamanho de voxel de 14µm. Na sequência, as projeções das imagens microtomográficas foram reconstruídas no software NRecon (versão 1.6.9.8, SkyScan 2005-2012, Bruker microCT®), com parâmetros de reconstrução padronizados para todas as amostras, sendo os coeficientes de atenuação mínimo de 0.006364 até 0.081541 de conversão máxima em escala de cinza, correção de Beam Hardening de 52% para conversão das imagens. Dessa forma, as projeções das imagens apresentadas foram convertidas em cortes microtomográficos compatíveis para serem analisados nos softwares subsequentes. Na sequência, as maxilas foram realinhadas no software DataViewer (versão 1.5.1.2, SkyScan 2004-2011, Bruker microCT®), nas três posições sugeridas pelo Software (Coronal, Sagital e Axial). Foram então realizadas análises quantitativas da neoformação óssea por meio do software CT Analyser (versão 1.14.4.1, SkyScan 2003-2011, 2012-2014 Bruker microCT®). Para tanto, a realização da delimitação de uma Região de Interesse (ou ROI

– do inglês Region Of Interest), no formato cilíndrico, de diâmetro 1x1mm com profundidade 2mm. Seguindo os parâmetros para quantificação de diferentes parâmetros trabeculares e corticais, foram quantificados os seguintes parâmetros: percentual de volume ósseo (BV/TV, %), número de trabéculas (Tb.N, 1/mm), espessura de trabéculas (Tb.Th mm) e separação de trabéculas (Tb.Sp, mm). Para definição de regiões de interesse, foram utilizadas padronizações previamente estabelecidas na literatura (GAO *et al.*, 2015).

3.11 Procedimentos Histotécnicos

Para o procedimento histotécnico os espécimes já finalizados das capturas de imagem e escaneamentos pelo microCT, foram lavadas em água corrente e acondicionados em solução de EDTA a 10% tamponado com pH 7,0, com trocas realizadas duas vezes por semana por 30 dias aproximadamente, até que não apresentassem resistência ao corte com navalha. Então, as amostras foram novamente lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina (Histosec® Merck, Darmstadt, Alemanha). Os blocos de parafina foram submetidos a cortes histológicos semi-seriados no sentido transversal ao longo eixo do alveolo, utilizando-se micrótomo Leica RM. Foram obtidos cortes semi-seriados de 5 µm de espessura para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e Picrosirius-Red, e cortes de 3 µm de espessura para técnica de imuno-histoquímica.

3.12 Análise Histológica

A análise qualitativa dos espécimes foi feita em todos os cortes corados em HE, considerando-se presença de tecido de granulação, neoformação, maturação e remodelação do tecido ósseo, atividade osteoclástica e/ou osteoblástica, bem como características da medula óssea.

3.13 Análise de Birrefringência em Picrosirius-Red (PS)

Para a análise de birrefringência os alvéolos da maxila foram analisados em microscópio de luz polarizada a fim de se avaliar a organização e quantidade de feixes de fibras colágenas considerando-se a intensidade de birrefringência da matriz colágena. A quantificação da intensidade do brilho de birrefringência foi realizada utilizando-se o software KS 300/400 com AxioVision versão 4.8 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Inicialmente foram definidos os espectros de cor verde, amarela e vermelha, seguindo valores de RGB (red, green, blue), os quais foram padronizados para todas as imagens (BIGUETTI *et al.*, 2018; VIEIRA *et al.*, 2015; VIVAN *et al.*, 2016). Para a quantificação, as imagens foram binarizadas nos respectivos espectros de cor acima mencionados e mensurados quanto à quantidade em pixels². Posteriormente, foram calculadas as médias dos valores em pixels² e submetidas à análise estatística para cálculo das médias e desvios-padrão de cada grupo em cada período experimental.

3.14 Técnica Imuno-histoquímica

A técnica imuno-histoquímica foi adaptada de Ortiz *et al.* (2018) e usada para identificar a presença e distribuição de células positivas para os marcadores, Osteoprotegerina (OPG) e Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP). As lâminas foram desparafinizadas por duas imersões de 15 minutos e uma imersão por 5 minutos em xilol. Posteriormente, os cortes foram reidratados concentrações decrescentes de álcool etílico, com duas imersões em álcool absoluto e uma imersão em álcool 70%, todos por 5 minutos e lavados em água. A recuperação antigênica foi feita em panela de pressão (Decloaking Chamber – Biocare Medical) usando solução de citrato pH 6,0 (Sigma-Aldrich) por dois ciclos, o primeiro ciclo a 80°C por 3 minutos e o segundo ciclo a 70°C por 3 minutos, seguidos de lavagem em solução salina com Tris (TBS; do inglês *Tris Buffered Saline*) pH 7,4. As lâminas foram devidamente marcadas ao entorno dos cortes, e estes foram então incubados em 3% peróxido de hidrogênio (Spring Bioscience Corporation, CA, USA) por 10 minutos para bloquear a peroxidase endógena atividade, lavadas em TBS e imersas com leite em pó desnatado a 7% por 15 minutos em temperatura ambiente (TA) para bloquear a ligação inespecífica com as proteínas séricas.

Os cortes foram incubados por 1 hora em TA com os seguintes anticorpos primários: anti-OPG (#10205, 1:100, BD Santa Cruz Biotechnology, Carpinteria, USA) ou anti-TRAP (#L2115, 1:100, BD Santa Cruz Biotechnology, Carpinteria, USA). Após a lavagem em TBS, os cortes foram incubados com o polímero secundário anti-goat (Impress Vector) por 30 minutos em TA. Ao final, foi utilizado o cromogéno 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB) (DAKO Carpinteria, CA) aplicado por 1 minuto e, após a lavagem em água, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Meyer, passaram por um banho em álcool 70°, dois banhos em álcool 100° e três banhos em xilol. Por fim, os cortes foram protegidos com auxílio de Permount e lamínula.

3.14.1 Análise Imuno-histoquímica

A quantificação dos marcadores foi realizada mediante padronização prévia estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa nos períodos de 7 e 21 dias para ambos os marcadores (BIGUETTI *et al.*, 2019). Inicialmente, as lâminas foram digitalizadas em imagens de alta resolução pelo Aperio Image Scope v. 12.3.3 (Leica Biosystems, Buffalo Grove, EUA). Posteriormente, a área do alvéolo foi demarcada para avaliação dos pixels positivos de acordo com a percentagem e intensidade da marcação pelo algoritmo Positive Pixel Count, utilizando o Aperio Image Scope (Leica Biosystems, Buffalo Grove, EUA). Posteriormente, todos os pixels positivos foram calculados e apenas os dados referentes a marcação intensa foram considerados como positivos, para excluir marcação inespecífica tecidual. Tecidos de controle negativo foram usados para confirmação da marcação e detecção negativa. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão para cada marcador.

3.15 Análise Estatística

Os dados quantitativos foram tabulados e submetidos ao software estatístico GraphPadInStat e Prism7 (GraphPad, San Diego, CA). Inicialmente, os dados foram avaliados quanto a distribuição de normalidade pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Comparações entre os grupos foram feitas utilizando o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de múltiplas comparações feitos pelo teste de Dunn's. Os valores

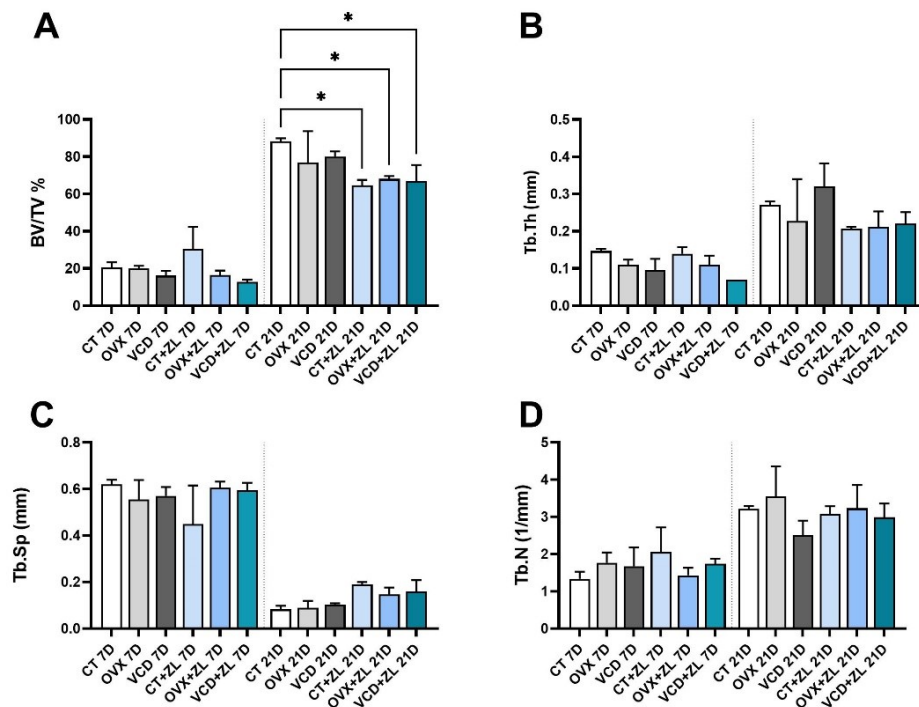
obtidos foram considerados de acordo com o nível de significância de 5% ($p < 0.05$) para todos os testes.

4 RESULTADOS

4.1 Análise MicroCT

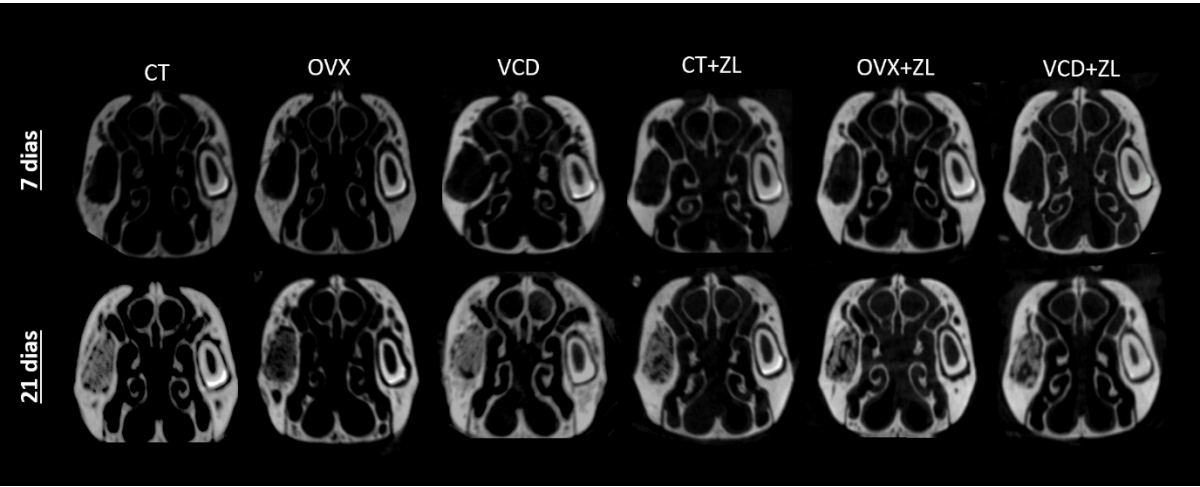
Aos 21 dias, o grupo CT apresentou aumento significativo de BV/TV (88.52 ± 2.114) em comparação ao grupo CT+ZL (64.67 ± 2.901). Do mesmo modo, os grupos VCD (80.05 ± 2.813) e OVX (80.05 ± 2.813) apresentaram aumento significativo deste mesmo parâmetro em comparação com VCD+ZL (67.03 ± 8.51) e OVX+ZL (68.08 ± 1.531), respectivamente (Figura 2A e Tabela 2). Os demais parâmetros não revelaram diferenças significativas entre os grupos nos mesmos períodos (Figura 2B, C e D e Figura 3)

Figura 2 – Resultados estatísticos referentes às análises microtomográficas dos alvéolos pós extração. A) Quantifica a área BV/TV%. B) Quantifica o número de Tb.Th(mm). C) Quantifica o número de Tb.Sp (mm). D) Quantifica o número de Tb.N (1/mm). Os (*) representam diferença estatisticamente significante entre os grupos.. A normalidade dos resultados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk. A análise estatística realizada utilizando-se os testes ANOVA seguido de Tukey, considerando $p < 0,05$.



Fonte: Autor, 2023

Figura 3 – Representação microtomográfica bidimensional dos alvéolos pós extração dos animais CT, OVX e ZL, tratados ou não com ZL. Imagens são apresentadas no sentido transaxial. Imagens obtidas pelo Software Data Viwer, Bruker (Skycan, Kontich, Belgium).



Fonte: Autor, 2023

Tabela 2 – Média e desvio-padrão obtidos a partir das análises microtomográficas dos alvéolos pós extração. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p<0,05$). Normalidade dos resultados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk. A análise estatística realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

	CT 7D	OVX 7D	VCD 7D	CT+ZL 7D	OVX+ZL 7D	VCD+ZL 7D	CT 21D	OVX 21D	VCD 21D	CT+ZL 21D	OVX+ZL 21D	VCD+ZL 21D
BV/TV	20,53± 2,865	20,06± 1,338	16,14± 2,574	30,43± 9,626	16,5± 2,398	12,78± 1,199	88,52± 2,114 ^a	76,94± 16,81 ^b	80,05± 2,813 ^c	64,67± 2,901 ^a	68,08± 1,531 ^b	67,03± 8,51 ^c
TB.TH	0,14± 0,005	0,11± 0,014	0,09± 0,031	0,13± 0,017	0,11± 0,024	0,07± 0	0,27± 0,014	0,22± 0,011	0,032± 0,062	0,20± 0,005	0,21± 0,0041	0,22± 0,031
TB.N	1,34± 0,185	1,77± 0,273	1,67± 0,508	2,14± 0,565	1,43± 0,204	1,74± 0,137	3,23± 0,098	3,54± 0,812	2,50± 0,391	3,08± 0,021	3,23± 0,631	2,988± 0,372
TB.SP	0,62± 0,02	0,55± 0,082	0,57± 0,038	0,42± 0,145	0,60± 0,026	0,59± 0,031	0,08± 0,021	0,09± 0,029	0,10± 0,005	0,19± 0,01	0,14± 0,028	0,16± 0,048

Os resultados são apresentados com as médias ($\pm$ SD) para cada parâmetro.

^a Indica diferença estatística significativa em relação ao grupo CT 21 dias

^b Indica diferença estatística significativa em relação ao grupo OVX 21 dias

^c Indica diferença estatística significativa em relação ao grupo VCD 21 dias

Fonte: Autor, 2023

4.2 Análise Histopatológica

Aos 7 dias, os alvéolos dos Grupos CT e CT+ZL, apresentaram similaridade nos aspectos histopatológicos, estando preenchidos por trabéculas ósseas primárias irregulares, concentradas na periferia do alvéolo em meio a tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos e discreto infiltrado inflamatório mononuclear. O Grupo OVX, apresentou trabéculas ósseas imaturas em intensa atividade osteogênica, com discreto infiltrado inflamatório, e presença de tecido conjuntivo frouxo, já no Grupo OVX+ZL foi possível observar trabéculas ósseas imaturas, delgada e irregular na periferia do alvéolo. No Grupo VCD, foi possível observar a presença de trabéculas ósseas neoformadas com matriz óssea desorganizada e osteócitos grosseiramente aprisionados na matriz envolto por tecido conjuntivo. Os alvéolos dos camundongos VCD+ZL também se apresentavam com raras trabéculas ósseas imaturas e desorganizadas. Chamou a atenção estarem restritas a periferia do alvéolo, em atividade de áreas de osteogênese, com grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo apresentando quase que a totalidade do alvéolo com a presença de infiltrado mononuclear discreto.

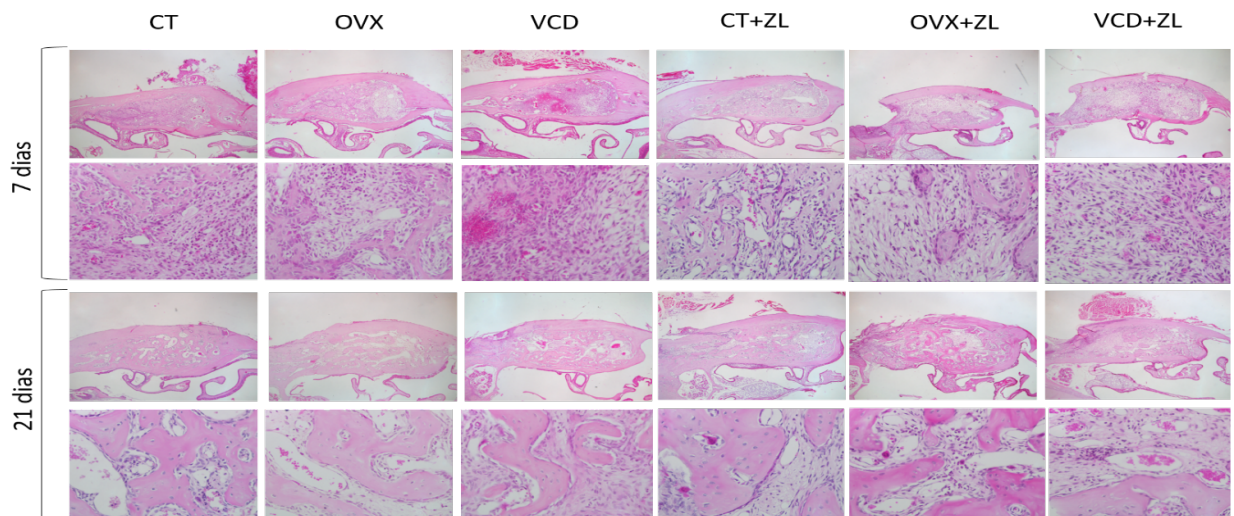
Aos 21 dias, os Grupos CT, VCD, CT+ZL, apresentaram presença de trabéculas ósseas maduras e regulares em remodelação óssea, envoltas por tecido conjuntivo frouxo e discreto infiltrado leucocitário mononuclear. Nos alvéolos do grupo OVX, contatou-se trabéculas ósseas maduras mais delgadas e espaçadas com osteócitos esparsos, permeadas por tecido conjuntivo frouxo vascularizado. No Grupo OVX+ZL, observou-se reparo ósseo alveolar, com grande quantidade de trabéculas ósseas espessas com pequeno espaçamento entre si e pouco celularizadas, com uma menor quantidade de tecido conjuntivo frouxo. De modo interessante os animais medicados com VCD+ZL, apresentaram alvéolo com presença de trabéculas ósseas irregulares em remodelação, esparsas entremeadas por tecido conjuntivo frouxo, atividade osteogênica, em maior concentração próximo a periferia do alvéolo, com grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo e infiltrado inflamatório discreto, além de apresentarem algumas lacunas vazias de osteócitos (Figura 4). As análises relatadas encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Aspectos histopatológicos dos alvéolos pós exodontia dos grupos CT, OVX, VCD, CT+ZL, OVX+ZL e VCD+ZL aos 7 e 21 dias.

Grupos	7 dias	21 dias
Controle	• Trabéculas ósseas imaturas, concentradas na periferia do alvéolo • Entremeadas por tecido conjuntivo frouxo com discreto infiltrado inflamatório mononuclear	• Trabéculas ósseas maduras e regulares em remodelação • Tecido conjuntivo frouxo com discreto infiltrado inflamatório
OVX	• Trabéculas ósseas imaturas em intensa atividade osteogênica • Discreto infiltrado inflamatório mononuclear • Tecido conjuntivo frouxo	• Trabécula óssea madura e delgada • Reduzida quantidade de osteócitos, envolto por tecido conjuntivo frouxo
VCD	• Trabécula óssea neoformadas e irregulares • Tecido conjuntivo com discreto infiltrado inflamatório mononuclear • Focos de coágulo.	• Trabéculas ósseas maduras e regulares, envolto por tecido conjuntivo frouxo
Controle+ZL	• Trabéculas ósseas neoformadas, concentradas na periferia do alvéolo • Tecido conjuntivo frouxo e presença de infiltrado inflamatório mononuclear discreto.	• Trabéculas ósseas maduras e espessas, envoltas por tecido conjuntivo frouxo • Osteoclastos arredondados e distante da matriz
OVX+ZL	• Trabécula óssea imatura, delgada e irregular na periferia do alvéolo • Tecido conjuntivo frouxo com discreto infiltrado inflamatório mononuclear	• Grande quantidade de trabéculas ósseas espessas • Menor quantidade de tecido conjuntivo frouxo • Numerosa quantidade de osteoclasto
VCD+ZL	• Raras trabéculas ósseas imaturas e desorganizadas, estritamente restrita a periferia do alvéolo • Grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo ocupando quase que a totalidade do alvéolo • Infiltrado inflamatório mononuclear discreto	• Alvéolo ósseo ainda em reparação • Trabéculas ósseas maduras e regulares em atividade osteogênica, em maior concentração próximo a periferia do alvéolo • Grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo com infiltrado inflamatório mononuclear

Fonte: Autor, 2023

Figura 4 – Aspectos histopatológicos após exodontia nos períodos de 7 e 21 dias, dos grupos CT, OVX, VCD, CT+ZL, OVX+ZL e VCD+ZL (HE, aumento original 10x e 40x).

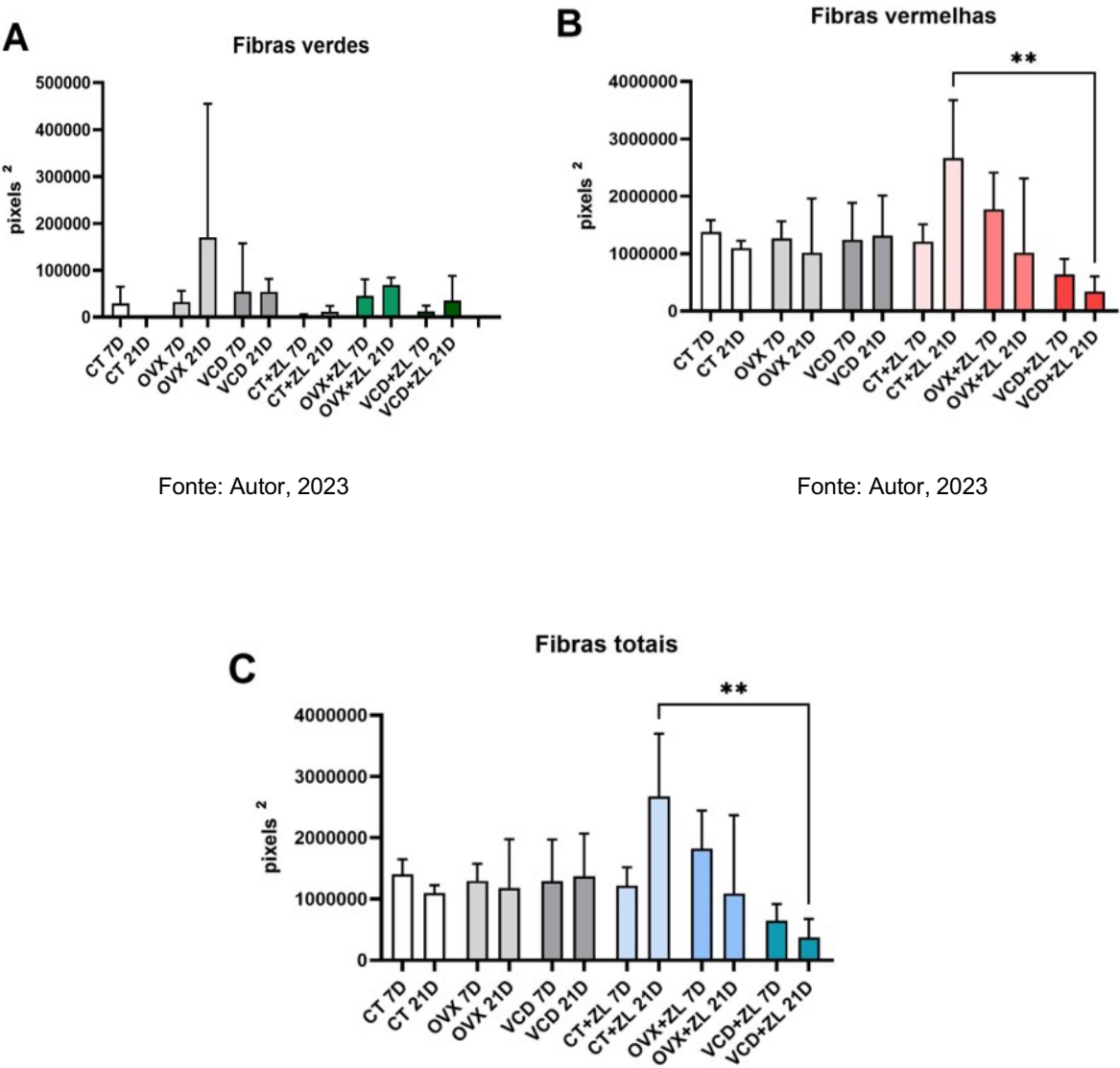


Fonte: Autor, 2023

4.3 Análise de Birrefringência em PS

Aos 21 dias, o grupo CT+ZL (266384 ± 1009672) apresentou aumento significativo de fibras vermelhas em comparação com VCD+ZL (338077 ± 266108) (Figura 5B), assim como fibras totais, CT+ZL (2675002 ± 1021698) com VCD+ZL (3773819 ± 299518) em pixels² (Figura 5C). Não foram detectadas diferenças significativas considerando-se as fibras verdes na comparação entre os grupos nos mesmos períodos (Figura 5A, Tabela 4, Figura 6).

Figura 5 – Resultados estatísticos referentes às análises do Picrosirius-Red dos alvéolos pós extração. A) Quantifica a área verde de fibras de colágeno. B) Quantifica a área de fibras vermelhas de colágeno. C) Quantifica a área total de fibras de colágeno. Os (*) representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A normalidade dos resultados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk. A análise estatística realizada utilizando-se os testes ANOVA seguido de Tukey, considerando $p<0,05$.



Fonte: Autor, 2023

Fonte: Autor, 2023

Fonte: Autor, 2023

Tabela 4 – Média e desvio-padrão obtidos a partir das análises de birrefringência dos alvéolos pós extração. Os (*) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Normalidade dos resultados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk. A análise estatística realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

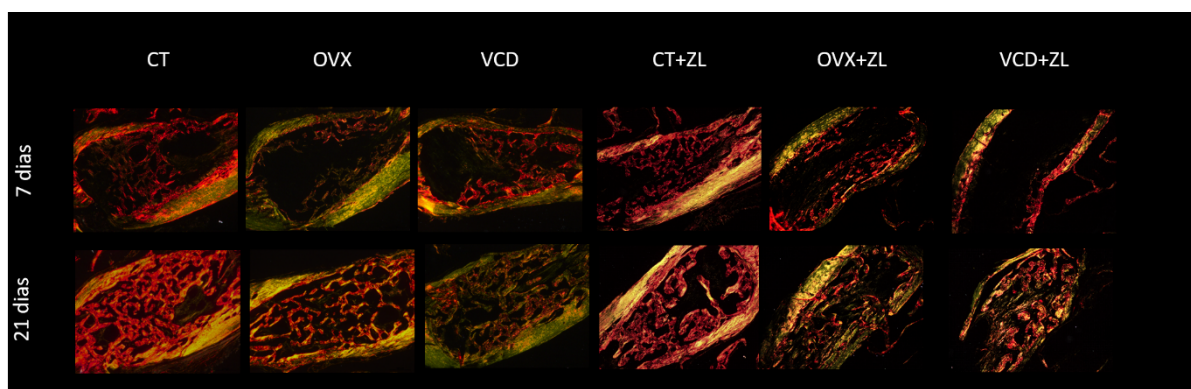
	CT 7D	OVX 7D	VCD 7D	CT+ZL 7D	OVX+ZL 7D	VCD+ZL 7D	CT 21D	OVX 21D	VCD 21D	CT+ZL 21D	OVX+ZL 21D	VCD+ZL 21D
FIBRAS VERDES	29013± 35759	31939± 24034	54563± 102875	3962± 2150	45386± 35382	12322± 11906	1017± 877,1	169796± 285435	53835± 27780	11161± 13001	68386± 16136	35743± 52530
FIBRAS VERMELHAS	1373911± 212128	1263375± 301278	1236912± 646730	1209582± 303748	1773189± 637726	639474± 269568	1094938± 129545	1013373± 949806	1316303± 695492	2663841± 1009672*	1018989± 1292134	338077± 266108*
TOTAL DE FIBRAS	1402924± 245746	1295314± 280210	1291475± 681363	1213544± 303187	1818575± 627058	649743± 268979	1095955± 128852	1183169± 793268	1370138± 699558	2675002± 1021698*	1087375± 1282301	373819± 299518*

Os resultados são apresentados com as médias ($\pm$ SD) para cada parâmetro.

*Indica diferença estatística significativa em relação ao grupo CT+ZL e VCD+ZL 21 dias, nas fibras totais e vermelhas.

Fonte: Autor, 2023

Figura 6 – Análise de birrefringência por Picrosirius-Red e quantificação das fibras de colágeno na região dos alvéolos nos períodos de 7 e 21 dias (aumento original 10x).

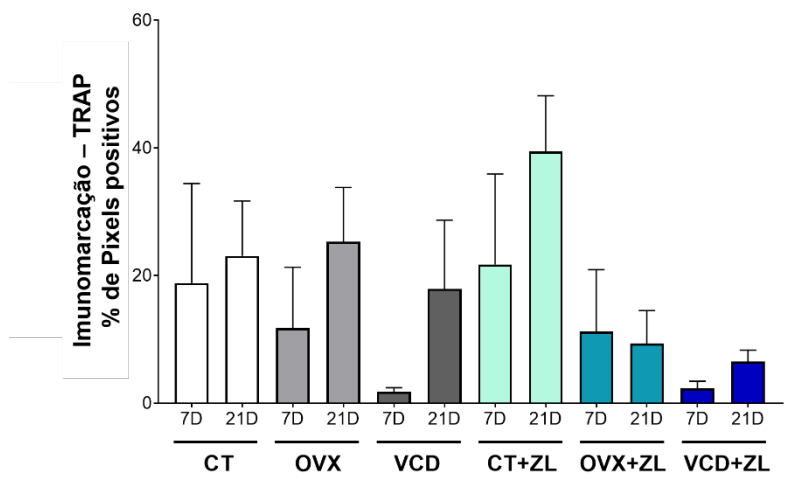


Fonte: Autor, 2023

4.4 Análise Imuno-histoquímica

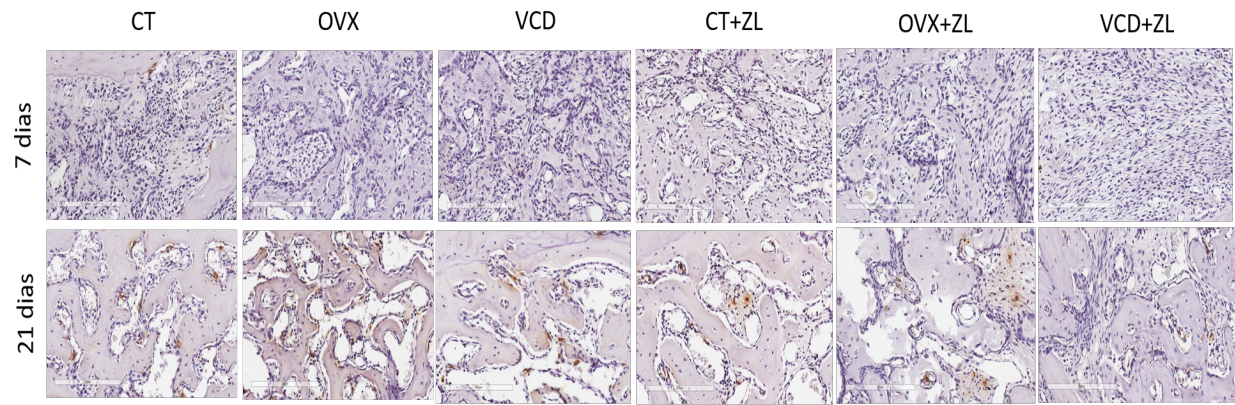
No período de 7 e 21 dias, a imunomarcagem para células TRAP+, não apresentaram diferença estatística significativa quando comparados entre os grupos. (Figura 7 e Figura 8). Já a imunomarcagem para OPG foi realizada para analisar a regulação do metabolismo ósseo dos alvéolos com a densidade de área (%) de osteoblastos (Figura 9). Nos períodos iniciais (07 dias) e, 21 dias, o qual não foi observado diferença estatística significativa de imunomarcagem para OPG em nenhum grupo (Figura 10). Nas análises de imuno-histoquímica, não houveram diferenças estatísticas significativas em nenhum grupo e período. (Tabela 5).

Figura 7 – Resultados estatísticos referentes às análises da imunomarcção para TRAP dos alvéolos pós extração. A normalidade dos resultados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk. A análise estatística realizada utilizando-se os testes ANOVA seguido de Tukey, considerando $p<0,05$.



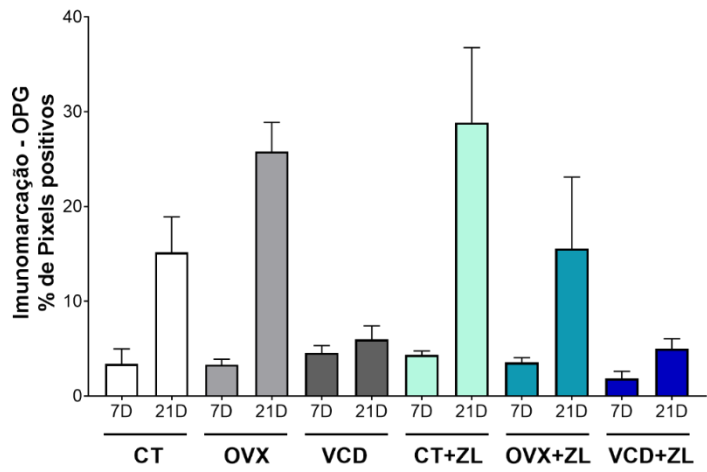
Fonte: Autor, 2023

Figura 8 – Imunomarcção para células TRAP+, aos 7 e 21 dias região dos alvéolos nos períodos de 7 e 21 dias (aumento original 20x obtida pelo Software Aperio ImageScope – v12.4.6.5003).



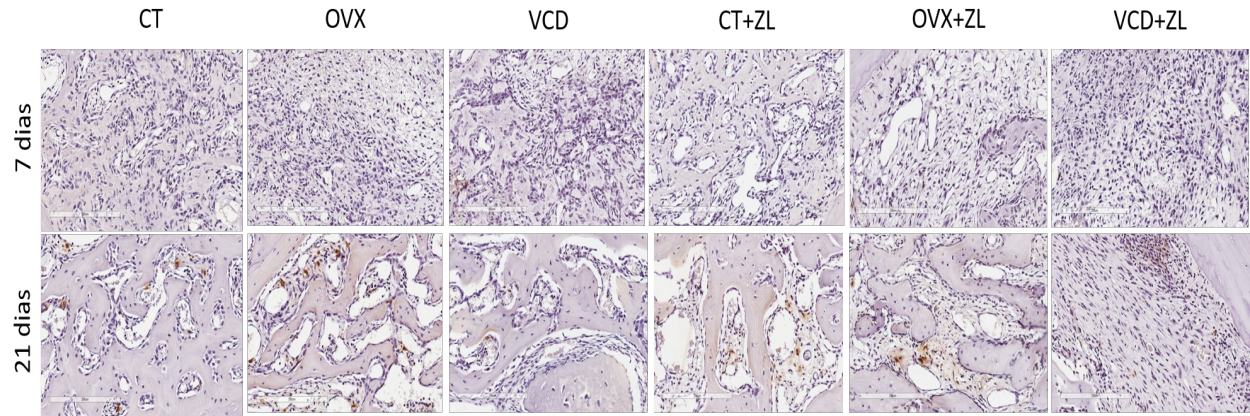
Fonte: Autor, 2023

Figura 9 – Resultados estatísticos referentes às análises da imunomarcagem para OPG dos alvéolos pós extração. A normalidade dos resultados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk. A análise estatística foi realizada utilizando-se os testes ANOVA seguido de Tukey, considerando $p<0,05$.



Fonte: Autor, 2023

Figura 10 – Imunomarcagem para OPG, na região dos alvéolos nos períodos de 7 e 21 dias (aumento original 20x obtida pelo Software Aperio ImageScope – v12.4.6.5003).



Fonte: Autor, 2023

Tabela 5 – Média e desvio-padrão obtidos a partir das análises de imunomarcacão TRAP e OPG dos alvéolos pós extração. A normalidade dos resultados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk. A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

	CT 7d	CT 21d	OVX 7d	OVX 21d	VCD 7d	VCD 21d	CT+ZL 7d	CT+ZL 21d	OVX+ZL 7d	OVX+ZL 21d	VCD+ZL 7d	VCD+ZL 21d
Total de TRAP	6609± 8764	8822± 4469	2585± 2455	19137± 16002	1171± 755	4381± 3714	1557± 687.8	18060± 12324	1028± 789.3	14279± 12952	1887± 846.4	5947± 3902
Total de OPG	3.387± 2.756	15.17± 8.317	3.305± 1.155	25.80± 6.887	4.548± 1.746	5.977± 2.472	4.330± 0.6081	28.85± 13.72	3.530± 1.131	15.57± 10.66	1.845± 1.528	4.980± 2.389

Fonte: Autor, 2023

5 DISCUSSÃO

O presente estudo foi proposto, a fim de investigar os efeitos destes diferentes métodos de falência ovariana precoce (FOP) no reparo ósseo utilizando o alvéolo dentário pós-exodontia como modelo de estudo. Nos modelos OVX, observa-se uma tendência das consequências que este procedimento causa no metabolismo ósseo interfere de modo significativo no reparo alveolar (KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016; RAMALHO-FERREIRA *et al.*, 2016; WRIGHT *et al.*, 2008). Em estudo realizado por Li e Wang (2018), houve um importante questionamento acerca da influência da OVX em modelo de camundongos BALBc no reparo pós exodontia de molar superior, constatando-se que o reparo pode ocorrer de forma mais lenta (dobro do tempo), que nos animais controles. Com o mesmo objetivo, estudos anteriores utilizando ratas (TANAKA *et al.*, 2001) e camundongos C57Bl/6J fêmeas também destacaram a reparação dos alvéolos dentários destes animais no grupo controle, o que não apresentou reparo significativamente mais lento em comparação, assim como observado em nosso estudo.

Pensando na influência que o tratamento com VCD pudesse ocasionar na neoformação óssea do interior dos alvéolos considerando-se a manutenção da androstenediona (WRIGHT *et al.*, 2008), no presente estudo chamou a atenção as características histológicas das trabéculas ósseas neoformadas, de aspecto irregular acompanhada de distribuição “desorganizada” dos osteócitos, na primeira semana do reparo, ficando evidente aos 21 dias a atividade osteoclástica mais intensa em comparação ao grupo OVX. Contrariamente a estudos que avaliam os efeitos do VCD no reparo de ossos longos ou intramembranosos não foram encontrados na literatura a fim de que se possa confrontar nossos resultados a outros. No entanto, pode-se inferir que a depleção folicular gradual, bem como a permanência de tecido ovariano nestes animais possa interferir de modo mais intenso na formação e maturação do tecido ósseo em áreas de reparação (KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016; LIU *et al.*, 2015).

Após conseguirmos demonstrar as condições clínicas pré-existentes, semelhantes a pacientes do sexo feminino em menopausa, a seleção da dose e protocolo de aplicação do ZL (500um/Kg/semanal) de escolha, baseou-se em estudos anteriores, que apresentam resultados de desenvolvimento de osteonecrose (BIGUETTI *et al.*, 2019; KOZUTSUMI *et al.*, 2022; POZZI *et al.*, 2009).

Na análise microtomografica, foi possível observar uma diferença estatística significativa entre os grupos CT vs CT+ZL, OVX vs OVX+ZL e VCD vs VCD+ZL, no período de 21 dias, com redução significativa nos valores do BV/TV%, nos grupos medicados com ZL, indo de encontro com trabalho realizado por Bigueti *et al.* (2019), o qual apresenta aplicação de 250ug/Kg de ZL, em camundongos fêmeas 129 S/v, idosas (15 meses), e a mesma resposta de redução nos parâmetros BV/TV% no grupo que recebeu a dose de ZL..

Assim com também foi observado em um estudo realizado por Kozutsumi e colaboradores (2022), os resultados de BV/TV%, na análise microCT dos grupos com doses de ZL consideradas altas (500ug/Kg e 1000ug /Kg) pelos autores. Apesar da dose administrada correlacionar com o nosso estudo, eles realizaram as análises em camundongos de 8 meses, sem induzir a menopausa, o que dificulta afirmar as evidências apresentadas (KOZUTSUMI *et al.*, 2022).

Além dos dados apresentados, relacionado a dose e modelo animal, a Associação Americana de Cirurgia Oral e Maxilofacial, incluiu uma variante de OMAMs sem exposição óssea (estágio 0), sem nenhuma evidência clínica de osso necrótico e ou/infeção, permitindo que não seja mais necessário aguardar esse quadro clínico citado para considerar um caso de OMAMs (RUGGIERO *et al.*, 2014). No presente trabalho, não observamos sinais clínicos de exposição óssea, osso necrótico, supuração, nestes animais (BIGUETTI *et al.*, 2019; KANG *et al.*, 2013; RUGGIERO *et al.*, 2014).

Apesar de usarmos a dose de ZL já utilizada na literatura para a indução da OMAM (BIGUETTI *et al.*, 2019; KOZUTSUMI *et al.*, 2022; POZZI *et al.*, 2009), as análises quantitativas de imunomarcção TRAP e OPG, MicroCT e PS, não apresentaram uma diferença significativamente estatística, não permitindo afirmar a ocorrência de uma indução de osteonecrose.

Até o momento final da escrita não foram encontrados trabalhos que correlacionassem as alterações encontradas no grupo VCD+ZL, de modo que não podemos justificar, porque da alteração encontrada apenas neles na análise de Picrosirius-Red, quando comparados ao grupo CT.

6 CONCLUSÃO

A partir destes resultados, pode-se concluir que no presente modelo, a FOP induzida por OVX e VCD não impedem a reparação óssea alveolar, mas interferirem na qualidade trabecular. Entretanto, o tratamento com ZL nos animais submetidos à FOP por VCD interferiu de modo importante, atrasando o processo de reparo ósseo intra-alveolar.

REFERÊNCIAS

- ARCEO-MENDOZA, R. M.; CAMACHO, P. M. postmenopausal osteoporosis: latest guidelines. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 50, n. 2, p.167-178, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2021.03.009>.
- ARCEO-MENDOZA, R. M.; CAMACHO, P. Prediction of fracture risk in patients with osteoporosis: a brief review. **Women's Health**, v. 11, n. 4, p. 477-484, 2015. DOI: <https://doi.org/10.2217/whe.15.14>.
- BACCARO, L. F. *et al.* The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. **Clinical Interventions in Aging**, v. 10, p.583-591, 2015. DOI: <https://doi.org/10.2147/CIA.S5614>.
- BERENSON, J. R. *et al.* A phase I dose-ranging trial of monthly infusions of zoledronic acid for the treatment of osteolytic bone metastases. **Clinical Cancer Research**, v. 7, n. 3, p. 478–485, 2001.
- BHATNAGAR, A.; KEKATPURE, A. L. Postmenopausal osteoporosis: a literature review. **Cureus**, v. 14, n. 9, p. 2-15, 2022. DOI: <https://doi.org/10.7759/cureus.29367>.
- BIGUETTI, C. C. *et al.* CCR2 Contributes to F4/80+ cells migration along intramembranous bone healing in maxilla, but its deficiency does not critically affect the healing outcome. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 1804, p. 1-15, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01804>.
- BIGUETTI, C. C. *et al.* Medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senescent female mice treated with zoledronic acid : Microtomographic , histological and immunohistochemical characterization. **Plos One**, v. 14, p. 1–22, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214173>.
- BOUXSEIN, M. L. *et al.* Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using microcomputed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468-1486, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbmr.141>.
- BRINTON, R. D. Minireview : translational animal models of human menopause : challenges and emerging opportunities. **Endocrinology**, v. 153, n. 8, p. 3571–3578, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1210/en.2012-1340>.
- BROOKS, H. L; FOLLOW, D. P; HOYER, P. B. The VCD mouse of menopause and

perimenopause for the study of sex differences in cardiovascular disease and the metabolic syndrome. **Physiology**, v. 31, n. 4, p. 250-257, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1152/physiol.00057.2014>.

COMPSTON, J *et al.* UK clinical guideline for the prevention and treatment of osteoporosis. **Archives of Osteoporosis**, v. 12, n. 1, p. 43, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11657-017-0324-5>.

COMPSTON, J. E.; MCCLUNG, M. R.; LESLIE, W. D. Osteoporosis. **Lancet** v. 393, n. 10169, p. 364–376, 2019. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32112-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32112-3).

CONSENSUS development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. **The American Journal of Medicine**, v. 94, n. 6, p. 646–650, 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(93\)90218-e](https://doi.org/10.1016/0002-9343(93)90218-e).

CORA, M. C.; KOOISTRA, L.; TRAVLOS, G. Cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vagina smears. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 6, p. 776-793, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>.

DYER, C. A. *et al.* Accelerated follicle depletion in vitro and in vivo in Sprague-Dawley rats using the combination of 4-vinylcyclohexene diepoxide and triptolide. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 44, n. 4, p. 9–17, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1638/1042-7260-44.4S.S9>.

EASTELL, R. *et al.* Postmenopausal osteoporosis. **Nature reviews. Disease primers**, v. 2, p. 1-17, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.69>.

FREEMANTLE, N. *et al.* Results of indirect and mixed treatment comparison of fracture efficacy for osteoporosis treatments: a meta-analysis. **Osteoporosis International**, v. 24, n. 1, p. 209-217, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00198-012-2068-9>.

GAO, C. *et al.* Micro CT analysis of spine architecture in a mouse model of scoliosis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, p. 38, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00038>.

GUPTA, M.; GUPTA, N. Bisphosphonate related jaw osteonecrosis. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2022.

HAMDY, R. C. Zoledronic acid : clinical utility and patient considerations in osteoporosis and low bone mass. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 4, p. 321–335, 2010. DOI: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S6287>.

HOEFERT, S. *et al.* Macrophages and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): evidence of local immunosuppression of macrophages in contrast to other infectious jaw diseases. **Clinical Oral Investigations**, v. 19, n. 2, p. 497–508, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1273-7>.

KANG, B. *et al.* Periapical Disease and Bisphosphonates Induce Osteonecrosis of the Jaws in Mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 28, n. 7, p. 1631-1640, 2013. DOI: <https://doi.org/10.102/jbmr.1894>.

KANIS, J. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. **The Lancet**, v. 359, n. 1, p. 1929-1936, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/D0140-6736\(02\)08761-5](https://doi.org/10.1016/D0140-6736(02)08761-5).

KANIS, J. A. *et al.* European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. **Osteoporosis International**, v. 30, n. 1, p.3-44, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00198-018-4704-5>.

KHAN, A. A *et al.* Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw : a systematic review and international consensus. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 30, n. 1, p. 3–23, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbmr.2405>.

KHAN, A. A. *et al.* Case-based review of Osteonecrosis of the Jaw (ONJ) and application of the international recommendations for management from the international task force on ONJ. **Journal of Clinical Densitometry**, v. 20, n. 1, p. 8–24, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jocd.2016.09.005>.

KILKENNY, C. *et al.* Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. **Plos Biology**, v. 8, n. 6, p. e1000412, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>.

KOEBELE, S. V.; BIMONTE-NELSON, H. A. Modeling menopause: the utility of rodents ins translational behavior endocrinology research. **Maturitas**, v. 87, p. 5–17, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.01.015>.

KOZUTSUMI, R. *et al.* Zoledronic acid deteriorates soft and hard tissue healing of mu-

rine tooth extraction sockets in a dose-dependent manner. **Calcified Tissue International**, v. 110, n. 1, p. 104-116, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00223-021-00890-9>.

LI, L.; WANG, Z. Ovarian anging and osteoporosis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1086, p. 199-215, 2018. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-13-1117-8_13.

LIU, W. *et al.* Conditions and possible mechanisms of VCD-induced ovarian failure. **Alternatives to Laboratory Animals**, v.43, n. 6, p. 385-392, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1177/026119291504300606>.

LOHFF, J. C. *et al.* Effect of duration of dosing on onset of ovarian failure in a chemical-induced mouse model of perimenopause. **Menopause**, v. 13, n. 3, p. 482-488, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.gme.0000191883.59799.2e>.

MANAGEMENT OF OSTEOPOROSIS IN POSTMENOPAUSAL WOMEN. Management of osteoporosis in postmenopausal women: the 2021 position statement of The North American Menopause Society. **Menopause**, v. 28, n. 9, p. 973-997, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000001831>.

MARTINS, L. H. I. *et al.* Frequency of osteonecrosis in bisphosphonate users dubmitted to dental procedures: a systematic review. **Oral Diseases**, v. 29, n. 1, p. 75-99, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1111/odi.14003>.

MAYER, L. P. *et al.* The follicle-deplete mouse ovary produces androgen 1. **Biology of Reproduction** v. 71, n. 1, p. 130–138, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.016113>.

MCLEAN, A. C. *et al.* Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. **Journal of Visualized Experiments**, n. 67, p. e8389, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3791/4389>.

MILLER, P. D. *et al.* Prediction of fracture risk in post-menopausal white women with peripheral bone densitometry: evidence from the National Osteoporosis Risk Assessment. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 12, p. 2222-2230, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.12.2222>.

OLSON, M. E.; BRUCE, J. Ovariohysterectomy and orchidectomy in rodents and rabbits. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 27, n. 12, p. 523–527, 1986.

ORTIZ, R. C. *et al.* CD44 and ALDH1 immunoexpression as prognostic indicators of invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 47, n.8, p. 740-747, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/jop.12734>.

POZZI, S. *et al.* High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. **American Association for Cancer Research**, v. 15, n. 18, p. 5829-5839, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0426>.

RACHNER, T. D.; KHOSLA, S.; HOFBAUER, L. C. Osteoporosis : now and the future. **Lancet**, v. 377, n. 9773, p. 1276–1287, 2011. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62349-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62349-5).

RAMALHO-FERREIRA, G. *et al.* Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. **Clinical Oral Investigations** v. 21, n. 5, p. 1485–1494, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-016-1909-x>.

REGINSTER, J. Y.; RABENDA, V. Patient preference in the management of postmenopausal osteoporosis with bisphosphonates. **Clinical Interventions in Anging**. v. 1, n. 4, p.415-423, 2006. doi: 10.2147/ciia.2006.1.4.415.

RUGGIERO, S. L. *et al.* American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw — 2014 update. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 72, n. 10, p. 1938–1956, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2014.04.031>.

SCHUIT, S. C. E. *et al.* Fracture incidence and association with bone mineral density in elderly men and women: the Rotterdam Study. **Bone**, v. 34, n. 1, p. 195–202, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2003.10.001>.

SIRIS, E. S. *et al.* Bone mineral density thresholds for pharmacological intervention to prevent fractures. **Archives of Internal Medicine**, v. 164, n. 10, p. 1108–1112, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.164.10.1108>.

SOUZA, V. *et al.* Description of Ovariectomy Protocol in Mice. **Methods in Molecular**

Biology, v. 1916, p. 303-309, 2019. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_29.

STONE, K. L. *et al.* BMD at multiple sites and risk of fracture of multiple types: long-term results from the Study of Osteoporotic Fractures. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 18, n. 11, p. 1947–1954, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.11.1947>.

TANAKA, S. *et al.* Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats. **Anatomical Records**, v.262, n. 2, p. 203-212, 2001. DOI: [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0185\(20010201\)262:2;1-AID-AR1030.3.0.CO;2-#](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0185(20010201)262:2;1-AID-AR1030.3.0.CO;2-#).

TEÓFILO, J. M.; BRENTGANI, L. G.; LAMANO-CARVALHO, T. L. Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. **Archives of Oral Biology**, v. 49, n. 9, p. 755–762, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2004.02.013>.

UNNANUNTANA, A. *et al.* The assessment of fracture risk. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 92, n. 3, p. 743–753, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.2106/JBJS.I.00919>.

VAN POZNAK, C. H. *et al.* American Society of Clinical Oncology Executive summary of the clinical practice guideline update on the role of bone-modifying agents in metastatic breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 9, p. 1221–1228, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.5209>.

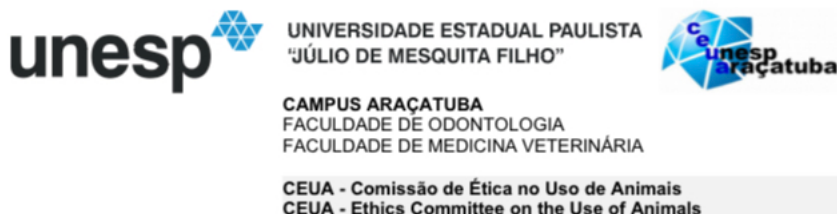
VIEIRA, A. E. *et al.* Intramembranous bone healing process subsequent to tooth extraction in mice: micro-computed tomography, histomorphometric and molecular characterization. **Plos One**, v. 10, n. 5, p. e0128021, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0128021>.

VIVAN, R. R. *et al.* Experimental maxillary sinus augmentation using a highly bioactive glass ceramic. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v. 27, n. 2, p. 41, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-015-5652-7>.

WRIGHT, L. E. *et al.* Comparison of skeletal effects of ovariectomy versus chemically induced ovarian failure in mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 23, n. 8, p. 1296-1303, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.080309>.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Impacto da condição de menopausa induzida quimicamente ou por ovariectomia sobre o desenvolvimento da OMAM pós exodontia em fêmeas de camundongos C57BL/6"**, Processo FOA nº 00910-2019, sob responsabilidade de Mariza Akemi Matsumoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 02 de Outubro de 2020.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 07 de Abril de 2022.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 07 de Maio de 2022.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Impact of chemically or ovariectomically induced menopause on the development of OMAM after extraction in younger mice C57BL/6"**, Protocol FOA nº 00910-2019, under the supervision of Mariza Akemi Matsumoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 02, 2020.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: April 07, 2022.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: May 07, 2022.

Prof. Associado Guilherme de Paula Nogueira
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br