

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 11/02/2028



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

**ANA CAROLINA ZUCON BACELAR MARCOLINO**

**INFLUÊNCIA DOS LEUCOTRIENOS NO REPARO E  
METABOLISMO ÓSSEO DE CAMUNDONGOS DE MEIA-  
IDADE COM FALÊNCIA OVARIANA INDUZIDA**

**Araçatuba - SP**  
**2026**

**ANA CAROLINA ZUCON BACELAR MARCOLINO**

**INFLUÊNCIA DOS LEUCOTRIENOS NO REPARO E  
METABOLISMO ÓSSEO DE CAMUNDONGOS DE MEIA-  
IDADE COM FALÊNCIA OVARIANA INDUZIDA**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do título de Doutora.

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariza Akemi Matsumoto

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Cristina Biguetti

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Hernandes Chaves Neto

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

M321i Marcolino, Ana Carolina Zucon Bacelar.  
Influência dos leucotrienos no reparo e metabolismo ósseo de camundongos de meia-idade com falência ovariana induzida / Ana Carolina Zucon Bacelar Marcolino. - Araçatuba, 2026  
58 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba  
Orientadora: Profa. Mariza Akemi Matsumoto  
Coorientadora: Profa. Cláudia Cristina Bigueti  
Coorientador: Prof. Antônio Hernandes Chaves Neto

1. Camundongos 2. Leucotrienos 3. Menopausa  
4. Osteoporose I. T.

Black D7  
CDD 617.64

Dedico este trabalho ao meu  
esposo, aos meus pais e meu  
irmão.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus e Nossa Senhora por me capacitarem e guiarem diariamente frente aos desafios.

Ao meu esposo, Paulo Henrique Marcolino, por caminhar ao meu lado e ser meu apoio e porto seguro na vida.

Aos meus pais, Sônia Maria Zucon Bacelar e José Fernando Bacelar, que sempre me apoiaram nos estudos e se dedicaram sem medidas para que eu alcançasse os meus sonhos.

Ao meu irmão, Fernando Zucon Bacelar, por ser meu grande amigo e inspiração.

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

À Prof<sup>a</sup>. Mariza Akemi Matsumoto, minha eterna orientadora. Agradeço por ensinar com maestria e orientar com postura e amor, seu trabalho reflete a grande mulher que é. Obrigada por todas as oportunidades e por caminharmos juntas além da ciência.

Aos meus coorientadores, Prof<sup>a</sup>. Claudia Cristina Bigueti e Prof. Antonio Hernandes Chaves Neto, por enriquecerem nosso grupo de pesquisa com seus conhecimentos e contribuições. Vocês são exemplos de dedicação e comprometimento.

Ao Prof. Edilson Ervolino, pela generosidade em compartilhar seu conhecimento, pelas contribuições valiosas e pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho, mesmo não sendo meu coorientador formal, certamente o foi por mérito.

À Prof<sup>a</sup>. Cristiane Furuse, por sua capacidade de permanecer firme e luminosa mesmo nos momentos mais difíceis, isso revela não apenas a grande profissional que é, mas, sobretudo, a mulher extraordinária que inspira todos ao seu redor. Sou profundamente grata pelas oportunidades que me proporcionou e por cada ensinamento compartilhado.

À Prof<sup>ª</sup>. Nataira Momesso, por ser um grande presente que recebi durante a pós-graduação e, desde então se tornou amiga, orientadora na especialização e madrinha. Sua dedicação e sensibilidade são fonte de inspiração e refletem a mulher forte e a admirável cirurgiã que é.

Ao Prof. Rafael Ortiz, uma pessoa incrível e um pesquisador brilhante. Obrigada por me auxiliar e acolher tão bem desde que nos conhecemos. Certamente você é a pessoa mais inteligente que conheço, mas também está incluso entre as mais generosas e empáticas. Obrigada por ter se tornado um amigo.

Aos amigos do Laboratório ORAL, Juliana Meira, Ana Julia Moreno, Ramez Mahamoud, Ana Carolyn Becher, Mariana Estochi, Caio Jesus, Gabriella Avante, Reginaldo Oliveira, Danilo Leite e Isabella Cairin, pela companhia nos experimentos e pela amizade.

À Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, através do Prof. Francisley Ávila Souza, Prof. Leonardo Perez Faverani, Prof<sup>ª</sup>. Ana Paula Bassi, Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior, Prof<sup>ª</sup>. Alessandra Aranega, Prof<sup>ª</sup>. Daniela Ponzoni, Prof. André Fabris e Prof. Osvaldo Magro Filho por todos os ensinamentos nas clínicas e plantões hospitalares.

Ao Departamento de Ciências Básicas, em especial à Disciplina de Histologia e Embriologia, através da Prof<sup>ª</sup>. Alaíde Gonçalves e Prof. Cláudio Casatti por serem inspirações na ciência e na vida. Aos servidores Eliseide Maria Ferreira Silva Navega, Arnaldo César dos Santos e Cristiane Braz da Silva Borges pelo carinho e convívio diário. Aos amigos Vinícius Ganzaroli, Naara Monteiro, Luan Toro, Ana Cláudia Rodrigues, Elisa Furquim, Juliana Moura, Laura Paludetto, Isadora Breseghello, Felipe Duarte e Tatiany Castro pela amizade, trabalhos, congressos e risadas compartilhadas.

À Disciplina de Patologia, através da Prof<sup>ª</sup> Renata Callestini e da Prof<sup>ª</sup>. Cristiane Furuse agradeço pela oportunidade de adentrar e aprender a amar o mundo do diagnóstico e por serem mulheres tão fortes e inspiradoras tanto na ciência como na vida.

Aos servidores técnicos dos laboratórios multiusuários da FOA - Natália Yoshie Ikegami, UNIPEX - Leandro Alves dos Santos e Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio (docente responsável) e FOB - Márcia Sirlene Zardin Graeff; cuja competência, disponibilidade e orientação foram essenciais para a realização das análises e para a qualidade dos resultados obtidos.

Ao Laboratório Multiusuário da FOA-UNESP e à FINEP (FINEP/CT-INFRA - Convênio FINEP: 01.12.0530.00 – PROINFRA 01/2011) pelo uso do equipamento de Microtomografia Computadorizada SkyScan 1272 e à Unesp (Edital 13/2021- Unesp Presente) pelo uso do equipamento Scanner de lâminas MoticEasyScan One.

Ao Laboratório Multiusuário da FMB-UNESP e à UNIPEX - Unidade de Pesquisa Experimental – FMB, Unesp, pelo uso do Microscópio Confocal Leica TCS – Subprojeto REDEQUIPEX (Convênio Finep 01.10.0578.00).

Ao Laboratório Multiusuário da FOB-USP e ao Centro Integrado de Pesquisas (CIP) pelo uso do Escaneador de Lâminas Aperio Scanscope CS (FAPESP 17/24984-0).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo nº 2022/09179-2.

“A fé e a razão caminham juntas,  
mas a fé vai mais longe”

Santo Agostinho

## RESUMO

MARCOLINO, A. C. Z. B. **Influência dos leucotrienos no reparo e metabolismo ósseo de camundongos de meia-idade com falência ovariana induzida**. 2026. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2026.

A menopausa é uma condição decorrente da falência ovariana e consequente depleção dos hormônios ovarianos. No entanto, há evidências de que um aumento na inflamação sistêmica associado a menopausa contribuem para ocorrência da deterioração do tecido ósseo. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi analisar o reparo ósseo alveolar em camundongos fêmeas 129SvEv WT sob terapia medicamentosa com o Montelukaste (MTK) e geneticamente modificadas (*knockout*) para 5-lipoxigenase (5LOKO) em fase de estropausa causada cirurgicamente (ovariectomia). Para tanto, foram utilizados 84 camundongos fêmeas com idades entre 10 a 14 meses, sendo 56 WT e 28 5LOKOs, divididos em grupos de acordo com os tratamentos: WT- Controle (sem tratamento), WT-MTK - MTK na dose de 4mg/kg, WT-OVX – submetidas à ovariectomia (OVX), WT-OVX-MTK – submetidas à OVX e medicadas com MTK, 5LOKO – Controle (sem tratamento), e 5LOKO-OVX – submetidas à OVX. Os animais dos grupos OVX foram submetidos à OVX 14 dias antes da exodontia do incisivo superior direito (ISD). Os animais dos grupos MTK receberam a primeira dose da medicação uma hora antes da exodontia, continuando a cada 24 horas até os períodos de eutanásia, de 7 e 21 dias após a exodontia, quando foram coletadas as maxilas contendo os alvéolos. Estas foram analisadas por meio de microtomografia computadorizada e, posteriormente, desmineralizados para análises das colorações HE, tricrômico de Goldner e Picrosirius-red e pela técnica da imunoperoxidase para os anticorpos DC STAMP, NFATc1, TRAP e OPG e imunofluorescência para co-localização dos anticorpos TRAP + DC STAMP e TRAP + NFATc1. Os dados quantitativos foram submetidos à testes estatísticos considerando-se  $p < 0,05$ . WT-MTK apresentou aumento nos parâmetros BV/TV e Tb.Th, reparo alveolar acelerado e menor marcação de células osteoclásticas. WT-OVX-MTK apresentou melhor reparo, maior organização das fibras colagênicas, assim como redução de marcadores osteoclásticos em comparação à WT-OVX. 5LOKO apresentou maior espessura trabecular em comparação à 5LOKO-OVX e ambos redução de células osteoclastogênicas. A

ausência da 5LO e, sobretudo, a administração do MTK exerceram efeitos benéficos sobre o reparo ósseo alveolar, promovendo melhora na qualidade do tecido ósseo e acelerando o processo de reparo ósseo. Ademais, atenuaram os efeitos deletérios decorrentes da estropausa.

**Palavras-chave:** camundongos; leucotrienos; menopausa; osteoporose.

## ABSTRACT

MARCOLINO, A. C. Z. B. **Influence of leukotrienes on bone repair and metabolism in middle-aged mice with induced ovarian failure.** 2026. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2026.

Menopause is a condition resulting from ovarian failure and consequent depletion of ovarian hormones. However, there is evidence that an increase in systemic inflammation associated with menopause contributes to the occurrence of bone tissue deterioration. Thus, the aim of the present study was to analyze alveolar bone repair in female 129SvEv WT mice under drug therapy with Montelukast (MTK) and genetically modified (knockout) for 5-lipoxygenase (5LOKO) in the surgically induced estropause phase (ovariectomy). For this purpose, 84 female mice aged between 10 and 14 months were used, 56 WT and 28 5LOKOs, divided into groups according to the treatments: WT- Control (no treatment), WT-MTK - MTK at a dose of 4mg/Kg, WT-OVX – subjected to ovariectomy (OVX), WT-OVX-MTK – subjected to OVX and medicated with MTK, 5LOKO – Control (no treatment), and 5LOKO-OVX – subjected to OVX. The animals in the OVX groups underwent OVX 14 days before the extraction of the right upper incisor (RUI). The animals in the MTK groups received the first dose of medication one hour before tooth extraction, continuing every 24 hours until the euthanasia periods, 7 and 21 days after extraction, when the maxillae containing the alveoli were collected. These samples were analyzed using micro-computed tomography and subsequently demineralized for HE, Goldner trichrome, and Picrosirius-red staining analyses, and by immunoperoxidase staining for DC STAMP, NFATc1, TRAP, and OPG antibodies, and immunofluorescence for co-localization of TRAP + DC STAMP and TRAP + NFATc1 antibodies. Quantitative data were subjected to statistical tests considering  $p < 0.05$ . WT-MTK showed an increase in BV/TV and Tb.Th parameters, accelerated alveolar repair, and lower osteoclastic cell marking. WT-OVX-MTK showed better repair, greater organization of collagen fibers, as well as a reduction in osteoclastic markers compared to WT-OVX. 5LOKO showed greater trabecular thickness compared to 5LOKO-OVX, and both showed a reduction in osteoclastogenic cells. The absence of 5LO and, above all, the administration of MTK exerted beneficial effects on alveolar bone repair, promoting

improved bone tissue quality and accelerating the bone repair process. Furthermore, they attenuated the deleterious effects resulting from estropause.

**Keywords:** mice; leukotrienes; menopause; osteoporosis.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Linha do tempo referente aos tratamentos e 20 procedimentos realizados nos grupos experimentais
- Figura 2 – Representação microtomográfica bidimensional dos 28 alvéolos pós-exodontia dos grupos WT, WT-OVX, WT-MTK, WT-OVX-MTK, 5LOKO e 5LOKO-OVX nos períodos de 7 e 21 dias. Análise da microarquitetura óssea por microCT para os parâmetros BV/TV, Tb.Th, Tb.N e Tb.Sp nos períodos de 7 e 21 dias dos alvéolos pós-exodontia
- Figura 3 – Fotomicrografias da análise de birrefringência obtidas 30 com microscópio de luz polarizada alvéolos pós-exodontia dos grupos WT, WT-OVX, WT-MTK, WT-OVX-MTK, 5LOKO e 5LOKO-OVX nos períodos de 7 e 21 dias (Picrosirius-red 5x)
- Figura 4 – Fotomicrografias da análise histopatológica dos alvéolos 32 pós-exodontia dos grupos WT, WT-OVX, WT-MTK, WT-OVX-MTK, 5LOKO e 5LOKO-OVX no período de 7 dias (HE 10x e 20x TG 10x)
- Figura 5 – Fotomicrografias da análise histopatológica dos alvéolos 33 pós-exodontia dos grupos WT, WT-OVX, WT-MTK, WT-OVX-MTK, 5LOKO e 5LOKO-OVX no período de 21 dias (HE 10x e 20x TG 10x)
- Figura 6 – Gráficos das análises imuno-histoquímicas para os 35 anticorpos DC STAMP, NFATc1, TRAP e OPG dos alvéolos dentais pós-exodontia aos 7 e 21 dias
- Figura 7 – Fotomicrografias da análise imuno-histoquímica para o 36 anticorpo DC STAMP dos alvéolos pós-exodontia dos grupos WT, WT-OVX, WT-MTK, WT-OVX-MTK, 5LOKO e 5LOKO-OVX nos períodos de 7 e 21 dias (20µm)
- Figura 8 – Fotomicrografias da análise imuno-histoquímica para o 37 anticorpo NFATc1 dos alvéolos pós-exodontia dos grupos WT, WT-

OVX, WT-MTK, WT-OVX-MTK, 5LOKO e 5LOKO-OVX nos períodos de 7 e 21 dias (20µm)

Figura 9 – Fotomicrografias da análise imuno-histoquímica para o anticorpo TRAP dos alvéolos pós-exodontia dos grupos WT, WT-OVX, WT-MTK, WT-OVX-MTK, 5LOKO e 5LOKO-OVX nos períodos de 7 e 21 dias (20µm)

Figura 10 – Fotomicrografias da análise imuno-histoquímica para o anticorpo OPG dos alvéolos pós-exodontia dos grupos WT, WT-OVX, WT-MTK, WT-OVX-MTK, 5LOKO e 5LOKO-OVX nos períodos de 7 e 21 dias (20µm)

Figura 11 – Fotomicrografias da análise de imunofluorescência dos anticorpos TRAP + DC STAMP dos alvéolos pós-exodontia dos grupos WT, WT-OVX, WT-MTK, WT-OVX-MTK, 5LOKO e 5LOKO-OVX no período de 7 dias

Figura 12 – Fotomicrografias da análise de imunofluorescência dos anticorpos TRAP + DC STAMP dos alvéolos pós-exodontia dos grupos WT, WT-OVX, WT-MTK, WT-OVX-MTK, 5LOKO e 5LOKO-OVX no período de 21 dias

Figura 13 – Fotomicrografias da análise de imunofluorescência dos anticorpos TRAP + NFATc1 dos alvéolos pós-exodontia dos grupos WT, WT-OVX, WT-MTK, WT-OVX-MTK, 5LOKO e 5LOKO-OVX no período de 7 dias

Figura 14 – Fotomicrografias da análise de imunofluorescência dos anticorpos TRAP + NFATc1 dos alvéolos pós-exodontia dos grupos WT, WT-OVX, WT-MTK, WT-OVX-MTK, 5LOKO e 5LOKO-OVX no período de 21 dias

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Divisão dos grupos e períodos experimentais, com a 19  
quantidade de animais (n) por grupo e período

Tabela 2 – Média e desvio-padrão obtidos a partir da análise da 27  
microarquitetura óssea por microCT para os parâmetros BV/TV,  
Tb.Th, Tb.N e Tb.Sp nos períodos de 7 e 21 dias dos alvéolos pós-  
exodontia

Tabela 3 – Média e desvio-padrão obtidos a partir da análise de 29  
birrefringência dos alvéolos pós-exodontia nos períodos de 7 e 21  
dias

Tabela 4 – Média e desvio-padrão obtidos a partir da análise imuno- 34  
histoquímica dos alvéolos pós-exodontia nos períodos de 7 e 21 dias

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Antiinflamatório não esteroidal
ANOVA	Análise de variância
CCCE	Centro de Criação de Camundongos Especiais
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CisLT	Cisteinil leucotrieno
COX	Cicloxigenase
DC STAMP	Proteína transmembrana específica de células dendríticas
DMO	Densidade mineral óssea
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
HE	Hematoxilina e eosina
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
ISD	Incisivo superior direito
KO	<i>Knockout</i>
LO	Lipoxigenase
LTB4	Leucotrieno B4
LTR1	Receptor 1 de cisteinil leucotrieno
MTK	Montelucaste de sódio
NFATc1	Fator nuclear de células T ativadas citoplasmático 1
OPG	Osteoprotegerina
OVX	Ovariectomia
PGE	Prostaglandina E
PVPI	Polivinil pirrolidona iodo degermante
TG	Tricrômico de Goldner
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
WT	<i>Wild type</i>
μCT	Microtomografia computadorizada

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Aspectos éticos	18
3.2 Modelo experimental	18
3.3 Delineamento experimental	19
3.4 Procedimento cirúrgico para ovariectomia	21
3.5 Avaliação da citologia vaginal diária	22
3.6 Procedimento cirúrgico para exodontia	22
3.7 Administração do MTK	22
3.8 Eutanásia, coleta e escaneamento dos espécimes	23
3.9 Procedimentos histotécnicos	24
3.10 Análise histopatológica	24
3.11 Análise de birrefringência	24
3.12 Análise via imunoperoxidase e imunofluorescência	25
3.13 Análise estatística	26
4 RESULTADOS	26
4.1 Análise da microarquitetura óssea por $\mu$ CT	26
4.1.1 Alvéolo	26
4.2 Análise de birrefringência	29
4.2.1 Alvéolo	29
4.3 Análise histopatológica	30
4.3.1 Alvéolo	30
4.4 Análise via imunoperoxidase e imunofluorescência dos alvéolos pós-exodontia	34
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXOS	53

## 1 INTRODUÇÃO

Por volta da quarta e quinta décadas de vida, as mulheres entram no período de perimenopausa, a qual inclui as fases iniciais e tardias da transição para a menopausa, marcada pela interrupção do ciclo menstrual por 12 meses consecutivos. Após esse período, as mulheres entram na fase da pós-menopausa, considerada inicial durante um ano após o evento da menopausa, e tardia após este período<sup>1</sup>. As manifestações da perimenopausa decorrem do processo de falência ovariana e, conseqüentemente, importante redução dos hormônios ovarianos, que pode perdurar por cerca de 4 a 6 anos, culminando na condição de menopausa fisiológica<sup>2</sup>. Os períodos de perimenopausa, menopausa e pós-menopausa estão intimamente ligados à uma série de manifestações clínicas que afetam diretamente a qualidade de vida das mulheres, especialmente a qualidade do tecido ósseo<sup>3,4,5</sup>. Entretanto, a menopausa pode ocorrer precocemente devido a presença de tumores ovarianos, quimioterapia e/ou radioterapia, bem como pela remoção cirúrgica dos ovários. Segundo um consenso realizado pela Fundação Europeia de Osteoporose e Doença Óssea no ano de 1993<sup>6</sup>, a osteoporose foi considerada uma doença esquelética sistêmica caracterizada pela baixa densidade mineral óssea (DMO) e deterioração da microarquitetura óssea, acometendo principalmente mulheres na fase pós-menopausa, aumentando o risco de fraturas ósseas devido à fragilidade existente. Embora seja considerada um problema de saúde pública, o diagnóstico da osteoporose muitas vezes ocorre após o primeiro episódio de fratura, uma vez que os pacientes não apresentam sintomatologia<sup>7</sup> e a prevenção ainda se mostra deficiente<sup>8</sup>.

A osteoporose experimental em murinos tem sido classicamente alcançada por meio de procedimento cirúrgico que envolve a remoção dos ovários, denominada ovariectomia (OVX), sendo considerado o modelo ideal para avaliar os efeitos específicos da privação dos hormônios gonadais<sup>2,9</sup>. O procedimento padrão é a excisão bilateral dos ovários (trompas de falópio) e pontas do corno uterino da cavidade peritoneal<sup>10</sup>. Apesar dessas possibilidades, vale ressaltar que este modelo não reproduz de modo fidedigno a menopausa fisiológica que ocorre na maioria das mulheres. Durante a menopausa a atrofia dos ovários ocorre gradualmente, e assim continuam a liberar hormônios andrógenos e baixos níveis de esteróides<sup>2</sup>. No entanto, o prejuízo ósseo provocado por este modelo permite

analisar os efeitos de intervenções terapêuticas e investigativas.

A dinâmica de remodelação e reparação óssea é influenciada por diferentes mecanismos e vias, fatores sistêmicos e locais que incluem a ação de hormônios, citocinas, quimiocinas, bem como estímulos biomecânicos<sup>11,12</sup>. No entanto, há tempos o papel de diferentes fatores inflamatórios na regulação e regeneração óssea vem sendo estudados, com diferentes enfoques, em particular considerando os efeitos de agentes farmacológicos já comercializáveis e empregados para alívio da dor e edema em injúrias ósseas<sup>13,14,15</sup>. Neste contexto, estudos sobre reparo de fraturas de ossos longos tem demonstrado a expressão das ciclooxigenases (COX) e lipoxigenases (LO) em suas diferentes fases<sup>16,17</sup>. Trabalhos de causa-e-efeito utilizando camundongos geneticamente modificados para COX1 e COX2 tem se mostrado elucidativos<sup>16,17,18</sup> demonstrando que camundongos COX1 *knockout* (KO) ou camundongos WT tratados com antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) não apresentam diferenças na formação de tecido ósseo durante o reparo de fraturas, enquanto que camundongos COX2-KO apresentam menores quantidades de cartilagem, osso, bem como reduzidas propriedades biomecânicas das regiões em reparo em relação aos animais COX1-KO e WT<sup>19</sup>. Na mesma linha, camundongos *knockout* para prostaglandina E1 (PGE1-KO), também apresentam deficiência na neoformação óssea pós-fratura comparados aos animais WT<sup>20</sup>. Outras evidências reforçam que as COXs, por meio da produção de PGEs, tem um papel anabólico sobre os osteoblastos, confirmando portanto, seu papel positivo na neoformação óssea e adicionalmente sobre a angiogênese<sup>19,21</sup>. De modo diferente, a enzima 5-LO, parece ter um papel mais decisivo sobre a osteoclastogênese, estimulando a mesma e, portanto, tendo um efeito catabólico sobre o tecido ósseo<sup>22,23</sup>. A 5-LO catalisa a conversão do ácido araquidônico em dois grupos principais de leucotrienos: Leucotrieno B4 (LTB4) e cisteinil leucotrieno (CisLT), os quais atuam via dois receptores acoplados à proteína G. Uma das funções do receptor-1 de CisLT (CisLTR1) é a indução do sinal de Ca<sup>2+</sup> intracelular. No início da osteoclastogênese, o RANKL aumenta a concentração de Ca<sup>2+</sup> no interior das células precursoras dos osteoclastos, ativando o fator nuclear de células T ativadas citoplasmático 1 (NFATc1), principal fator de transcrição dos genes osteoclasticos, pela fosfatase calcineurina e deste modo, regulando a formação dos osteoclastos via sinalização deste íon<sup>24</sup>. Considerando especialmente a enzima 5-LO sobre o

reparo ósseo, Bonewald *et al.* (1997)<sup>23</sup> e Manigrasso e O'Connor (2010)<sup>25</sup> demonstraram por meio de estudos com camundongos 5LOKO, um fenótipo ósseo com espessamento da cortical e processo de reparo mais acelerado de fratura de fêmur nestes animais comparados a camundongos WT. Estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa utilizando camundongos 129Sv 5-LOKO, também demonstrou que esses animais apresentaram diferenças importantes na fenotipagem óssea, sugerindo que a ausência desta enzima desempenha um papel protetor nos ossos intramembranosos e endocondrais de camundongos fêmeas idosas, além de ser capaz de impactar significativamente a capacidade de cura músculo-esquelética durante o envelhecimento, sugerindo a via de sinalização da 5LO como um alvo potencial para intervenções contra a osteoporose<sup>26</sup>. No entanto, animais 5LOKO crescem e se desenvolvem sem a presença desta enzima, o que pode acionar vias de compensação ainda não identificadas. Assim, faz-se interessante investigar a ausência da ação da 5LO ou de seus principais metabólitos de modo pontual, como por exemplo, por meio medicamentoso.

Na área da odontologia, a saúde óssea mostra especial relevância uma vez que reabilitações orais implanto-suportadas dependem não somente de uma quantidade óssea adequada, mas principalmente, de sua qualidade<sup>27,28</sup>, e estratégias que possam contribuir com estas condições são dignas de serem exploradas. Deste modo, o Montelukaste® (MTK) mostra-se uma alternativa terapêutica interessante por se tratar de uma droga que atua na inibição seletiva do receptor do CisLTR-1<sup>29,30,31</sup>, amplamente utilizado para o tratamento de doenças inflamatórias respiratórias crônicas mediadas por CisLTs, tais como a asma e a rinite alérgica<sup>31</sup>. No entanto, quando utilizado em modelo de reparo de fraturas de ossos longos, revelou resultado positivos<sup>24</sup>. Sugere-se que este medicamento seja capaz de modular a formação de osteoclastos e, conseqüentemente, promover efeito protetor sobre a perda óssea relacionada à osteoclastogênese excessiva<sup>31,32</sup>, sendo de interesse para estudos relacionados à osteoporose. Além disso, estudo utilizando camundongos fêmeas idosas 5LOKO sugeriu que a inibição genética da 5LO tem atuação direta sobre a modulação e resolução da inflamação durante o envelhecimento, uma vez que os animais apresentaram diferenças importantes na fenotipagem óssea<sup>26</sup>.

O efeito dose-resposta do MTK em modelo de reparo intra-alveolar utilizando

camundongos machos jovens já foi desenvolvido pelo presente grupo de pesquisa, investigando-se as doses de 2 e 4 mg/Kg nos períodos experimentais de 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Resultados interessantes foram obtidos, confirmando-se a neoformação óssea precoce nos animais medicados com ambas as doses de MTK, o que resultou em melhora significativa da microarquitetura trabecular observada pela microtomografia computadorizada aos 14 e 21 dias<sup>33</sup>.

Considerando-se que os eventos inflamatórios repercutem de modos distintos em indivíduos do sexo biológico feminino e masculino, bem como pelo processo de envelhecimento<sup>34,35,36</sup>, propõe-se o desenvolvimento do presente estudo, a fim de se avaliar os efeitos da inibição genética da 5LO, bem como a inibição medicamentosa do CisTLR1 em camundongos fêmeas de meia-idade submetidas à falência ovariana induzida. Este modelo se justifica pelas condições fisiológicas em que estes animais se encontram neste período da vida, uma vez que já exibem alterações de senescência detectáveis em alguns biomarcadores do envelhecimento<sup>37</sup>, refletindo nas suas condições esqueléticas e cujas respostas ocorrerão neste contexto. Ademais, considera-se que a maioria dos modelos de OVX utilizam animais jovens<sup>38,39,40</sup>, os quais ainda não sofreram os efeitos da senescência<sup>41</sup>, o que possivelmente possa interferir nas respostas aos desafios biológicos a serem investigados.

## **6 CONCLUSÃO**

A partir dos resultados obtidos, concluímos que a deficiência dos hormônios gonadais induzida pela OVX em animais de meia-idade promoveu efeitos deletérios sobre o reparo ósseo alveolar, evidenciando comprometimento da qualidade tecidual e intensificação da atividade reabsortiva. Nesse cenário, a ausência da 5LO e, principalmente, o uso do MTK exerceram efeitos moduladores benéficos sobre o processo de reparo ósseo alveolar, promovendo melhora na qualidade do tecido ósseo e acelerando o processo de reparo ósseo. Assim, os achados deste estudo reforçam o papel da via dos leucotrienos na regulação do microambiente osteoimune e indicam que o MTK desponta como um potencial alvo para futuras estratégias terapêuticas voltadas à otimização do reparo e à manutenção da qualidade do tecido ósseo.

## REFERÊNCIAS

1. Soules MR, Sherman S, Parrott E, Rebar R, Santoro N, Utian W et al. Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). *Fertil Steril*. 2001 Nov;76(5):874-8. doi: 10.1016/s0015-0282(01)02909-0. PMID: 11704104.
2. Koebele SV, Bimonte-Nelson HA. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. *Maturitas*. 2016 May;87:5-17.
3. Jones CM, Boelaert K. The Endocrinology of Ageing: A Mini-Review. *Gerontology*. 2015;61(4):291-300.
4. Takahashi TA, Johnson KM. Menopause. *Med Clin North Am*. 2015 May;99(3):521-34.
5. Gracia CR, Freeman EW. Onset of the Menopause Transition: The Earliest Signs and Symptoms. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2018 Dec;45(4):585-597.
6. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med*. 1993 Jun;94(6):646-50.
7. Unnanuntana A, Gladnick BP, Donnelly E, Lane JM. The assessment of fracture risk. *J Bone Joint Surg Am*. 2010 Mar;92(3):743-53. doi: 10.2106/JBJS.I.00919. PMID: 20194335; PMCID: PMC2827823.
8. Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future. *Lancet*. 2011 Apr 9;377(9773):1276-87. doi: 10.1016/S0140-6736(10)62349-5. Epub 2011 Mar 28. PMID: 21450337; PMCID: PMC3555696.
9. Brooks HL, Pollow DP, Hoyer PB. The VCD Mouse Model of Menopause and Perimenopause for the Study of Sex Differences in Cardiovascular Disease and the Metabolic Syndrome. *Physiology (Bethesda)*. 2016 Jul;31(4):250-7.
10. Olson ME, Bruce J. Ovariectomy, ovariectomy and orchidectomy in rodents and rabbits. *Can Vet J*. 1986;27(12):523-527.
11. Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys*. 2008 May 15;473(2):201-9.
12. Franco C, Patricia HR, Timo S, Claudia B, Marcela H. Matrix Metalloproteinases as Regulators of Periodontal Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2017 Feb 17;18(2):440.
13. Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue engineering Part B, Reviews*.

- 2008 Jun;14(2):179-86. PubMed PMID: 18544015. Pubmed Central PMCID: 2962857.
14. Matsumoto MA, De Oliveira A, Ribeiro Junior PD, Nary Filho H, Ribeiro DA. Short-term administration of non-selective and selective COX-2 NSAIDs do not interfere with bone repair in rats. *Journal of molecular histology*. 2008 Aug;39(4):381-7. PubMed PMID: 18592140.
  15. Matsumoto MA, Ferino RV, Monteleone GF, Ribeiro DA. Low-level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats. *Lasers in medical science*. 2009 Mar;24(2):195-201. PubMed PMID: 18309458.
  16. Lin HN, O'Connor JP. Immunohistochemical localization of key arachidonic acid metabolism enzymes during fracture healing in mice. *PloS one*. 2014;9(2):e88423. PubMed PMID: 24516658. Pubmed Central PMCID: 3917894.
  17. Chen YC, Lin YH, Wang SH, Lin SP, Shung KK, Wu CC. Monitoring tissue inflammation and responses to drug treatments in early stages of mice bone fracture using 50 MHz ultrasound. *Ultrasonics*. 2014 Jan;54(1):177-86. doi: 10.1016/j.ultras.2013.06.008. Epub 2013 Jul 11. PMID: 23871514; PMCID: PMC4047674.
  18. Moura AP, Taddei SR, Queiroz-Junior CM, Madeira MF, Rodrigues LF, Garlet GP, et al. The relevance of leukotrienes for bone resorption induced by mechanical loading. *Bone*. 2014 Dec;69:133-8. PubMed PMID: 25270168.
  19. O'Connor JP, Manigrasso MB, Kim BD, Subramanian S. Fracture healing and lipid mediators. *BoneKEy reports*. 2014;3:517. PubMed PMID: 24795811. Pubmed Central PMCID: 4007165.
  20. Yamakawa K, Kamekura S, Kawamura N, Saegusa M, Kamei D, Murakami M, et al. Association of microsomal prostaglandin E synthase 1 deficiency with impaired fracture healing, but not with bone loss or osteoarthritis, in mouse models of skeletal disorders. *Arthritis and rheumatism*. 2008 Jan;58(1):172-83. PubMed PMID: 18163499.
  21. Simon AM, O'Connor JP. Dose and time-dependent effects of cyclooxygenase-2 inhibition on fracture-healing. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2007 Mar;89(3):500-11. PubMed PMID: 17332098.
  22. Garcia C, Boyce BF, Gilles J, Dallas M, Qiao M, Mundy GR, et al. Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1996 Nov;11(11):1619-27. PubMed PMID: 8915769.
  23. Bonewald LF, Flynn M, Qiao M, Dallas MR, Mundy GR, Boyce BF. Mice lacking 5-lipoxygenase have increased cortical bone thickness. *Advances in*

- experimental medicine and biology. 1997;433:299-302. PubMed PMID: 9561156.
24. Kang JH, Ting Z, Moon MR, Sim JS, Lee JM, Doh KE et al. 5-Lipoxygenase inhibitors suppress RANKL-induced osteoclast formation via NFATc1 expression. *Bioorg Med Chem*. 2015 Nov 1;23(21):7069-78.
  25. Manigrasso MB, O'Connor JP. Accelerated fracture healing in mice lacking the 5-lipoxygenase gene. *Acta Orthop*. 2010;81(6):748-755. doi:10.3109/17453674.2010.533931.
  26. Bigueti CC, Couto MCR, Silva ACR, Shindo JVTC, Rosa VM, Shinohara AL et al. New Surgical Model for Bone-Muscle Injury Reveals Age and Gender-Related Healing Patterns in the 5 Lipoxygenase (5LO) Knockout Mouse. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Aug 11;11:484.
  27. Li J, Yin X, Huang L, Mouraret S, Brunski JB, Cordova L et al. Relationships among Bone Quality, Implant Osseointegration, and Wnt Signaling. *J Dent Res*. 2017 Jul;96(7):822-831. doi: 10.1177/0022034517700131. Epub 2017 Mar 22. PMID: 28571512; PMCID: PMC5480808.
  28. Johnson TB, Siderits B, Nye S, Jeong YH, Han SH, Rhyu IC et al. Effect of guided bone regeneration on bone quality surrounding dental implants. *J Biomech*. 2018 Oct 26;80:166-170. doi: 10.1016/j.jbiomech.2018.08.011. Epub 2018 Aug 22. PMID: 30170838; PMCID: PMC6233303.
  29. Theron AJ, Steel HC, Tintinger GR, Gravett CM, Anderson R, Feldman C. Cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonists as modulators of innate immune cell function. *J Immunol Res*. 2014;2014:608930.
  30. Wei J, Chen S, Huang C, Guo W, Yang S, Feng B et al. Antagonism of cysteinyl leukotriene receptor 1 (cysLT1R) by montelukast regulates differentiation of MC3T3-E1 cells under overloaded mechanical environment. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 1;495(1):995-1001.
  31. Kang JH, Lim H, Lee DS, Yim M. Montelukast inhibits RANKL-induced osteoclast formation and bone loss via CysLTR1 and P2Y12. *Mol Med Rep*. 2018 Aug;18(2):2387-2398.
  32. Zheng C, Shi X. Cysteinyl leukotriene receptor 1 (cysLT1R) regulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46(sup3):S64-S70. doi: 10.1080/21691401.2018.1489264. Epub 2018 Sep 5. PMID: 30183378.
  33. Ribeiro KHC, da Silva RBP, Roseno ACB, Barreto AJM, Bacelar ACZ, Ervolino E et al. Dose-response effect of Montelukast on post-extraction dental socket repair and skeletal phenotype of mice. *Odontology*. 2023 Oct;111(4):891-903. doi: 10.1007/s10266-023-00800-5. Epub 2023 Mar 15. PMID: 36920595.

34. Elis S, Courtland HW, Wu Y, Rosen CJ, Sun H, Jepsen KJ, et al. Elevated serum levels of IGF-1 are sufficient to establish normal body size and skeletal properties even in the absence of tissue IGF-1. *J Bone Miner Res.* 2010. 25:1257–66. doi: 10.1002/jbmr.20
35. Elis S, Wu Y, Courtland HW, Sun H, Rosen CJ, Adamo ML, et al. Increased serum IGF-1 levels protect the musculoskeletal system but are associated with elevated oxidative stress markers and increased mortality independent of tissue igf1 gene expression. *Aging Cell.* 2011. 10:547–50. doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00683.x
36. Wang Z, Bian L, Mo C, Kukula M, Schug KA, Brotto M. Targeted quantification of lipid mediators in skeletal muscles using restricted access media-based trap-and-elute liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2017. 984:151–61. doi: 10.1016/j.aca.2017.07.024
37. Fox JG, Barthold S, Davisson M, Newcomer CE, Quimby FW, Smith A. *The mouse in biomedical research.* 2nd ed. London: Elsevier, Inc.; 2007.
38. Yuan T, Li J, Zhao WG, Fu Y, Liu SN, Liu Q, et al. Effects of Estrogen on Insulin Sensitivity and Adipokines in Mice. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 2015 Jun;37(3):269-73. doi: 10.3881/j.issn.1000-503X.2015.03.004. PMID: 26149135.
39. Borges CC, Bringhenti I, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Vitamin D restriction enhances periovarian adipose tissue inflammation in a model of menopause. *Climacteric.* 2020;23(1):99-104. doi:10.1080/13697137.2019.1597841
40. Lei Z, Wu H, Yang Y, Hu Q, Lei Y, Liu W, et al. Ovariectomy Impaired Hepatic Glucose and Lipid Homeostasis and Altered the Gut Microbiota in Mice with Different Diets. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021 Jun 30;12:708838. doi: 10.3389/fendo.2021.708838. PMID: 34276568; PMCID: PMC8278766.
41. Francisco JI, Yu Y, Oliver RA, Walsh WR. Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. *J Orthop Res.* 2011 Feb;29(2):189-96. doi: 10.1002/jor.21217. Epub 2010 Aug 18. PMID: 20722002.
42. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010;8(6):e1000412. Published 2010 Jun 29. doi:10.1371/journal.pbio.1000412
43. Mahmoud RH, Bigueti CC, Simionato GB, Custódio IC, Silva RBP, Duarte MAH, et al. Alveolar socket healing in 5-lipoxygenase knockout aged female mice treated or not with high dose of zoledronic acid. *Sci Rep.* 2021;11(1):19535. Published 2021 Oct 1. doi:10.1038/s41598-021-98713-2

44. Souza VR, Mendes E, Casaro M, Antiorio ATFB, Oliveira FA, Ferreira CM. Description of Ovariectomy Protocol in Mice. *Methods Mol Biol.* 2019;1916:303-309. doi:10.1007/978-1-4939-8994-2\_29
45. Cora MC, Kooistra L, Travlos G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicol Pathol.* 2015;43(6):776-793. doi:10.1177/0192623315570339
46. McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SA. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp.* 2012;(67):e4389. Published 2012 Sep 15. doi:10.3791/4389
47. Bigueti CC, Oliva AH, Healy K, Mahmoud RH, Custódio IC, Constantino DH, 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.* 2019; 14(6): e0214173.
48. Vivian RR, Mecca CE, Bigueti CC, Renno AC, Okamoto R, Cavenago BC, et al. Experimental maxillary sinus augmentation using a highly bioactive glass ceramic. *J Mater Sci Mater Med.* 2016;27(2):41. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5652-7>.
49. Dutta S, Sengupta P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sci.* 2016;152:244-248. doi:10.1016/j.lfs.2015.10.025
50. Schmid T, Kanewska A, Lam C, Kalbitz M, Dieterich S, Ignatius A, et al. Influence of Age on Fracture Healing in Young and Middle-Aged Mice in a Proximal Femur Fracture Model. *J Orthop Res.* Published online September 10, 2025. doi:10.1002/jor.70063
51. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1092:385-396. doi:10.1196/annals.1365.035
52. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol.* 2008;61(5):577-587. doi:10.1136/jcp.2007.048868
53. Tang Y, Peng B, Liu J, Liu Z, Xia Y, Geng B. Systemic immune-inflammation index and bone mineral density in postmenopausal women: A cross-sectional study of the national health and nutrition examination survey (NHANES) 2007-2018. *Front Immunol.* 2022;13:975400. Published 2022 Sep 8. doi:10.3389/fimmu.2022.975400
54. Chen S, Sun X, Jin J, Zhou G, Li Z. Association between inflammatory markers and bone mineral density: a cross-sectional study from NHANES 2007-2010. *J Orthop Surg Res.* 2023;18(1):305. Published 2023 Apr 17. doi:10.1186/s13018-023-03795-5

- 55.** Khosla S, Monroe DG. Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(1):a031211. Published 2018 Jan 2. doi:10.1101/cshperspect.a031211
- 56.** Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K, et al. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J Histochem Cytochem.* 2014;62(10):751-758. doi:10.1369/0022155414545787
- 57.** López De Padilla CM, Coenen MJ, Tovar A, De la Vega RE, Evans CH, Müller SA. Picrosirius Red Staining: Revisiting Its Application to the Qualitative and Quantitative Assessment of Collagen Type I and Type III in Tendon. *J Histochem Cytochem.* 2021;69(10):633-643. doi:10.1369/00221554211046777
- 58.** Takegahara N, Kim H, Choi Y. Unraveling the intricacies of osteoclast differentiation and maturation: insight into novel therapeutic strategies for bone-destructive diseases. *Exp Mol Med.* 2024;56(2):264-272. doi:10.1038/s12276-024-01157-7
- 59.** Ibáñez L, Nácher-Juan J, Terencio MC, Ferrándiz ML, Alcaraz MJ. Osteostatin Inhibits M-CSF+RANKL-Induced Human Osteoclast Differentiation by Modulating NFATc1. *Int J Mol Sci.* 2022;23(15):8551. Published 2022 Aug 1. doi:10.3390/ijms23158551

## ANEXO

### ANEXO A – Certificado de aprovação do CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Influência dos leucotrienos no reparo ósseo intramembranoso de camundongos de meia-idade com falência ovariana induzida", Processo FOA nº 0569-2022, 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 26 de Setembro de 2022.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 27 de Maio de 2025.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 27 de Junho de 2025.

#### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Influence of leukotrienes on intramembranous bone repair of middle-aged mice with induced ovarian failure", Protocol FOA nº 0569-2022, 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 September 26, 2022.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** May 27, 2025.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** June 27, 2025.

**Prof. Dr. João Carlos Callera**  
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, 1103 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP  
Fone (16) 3638-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br