

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 12/02/2027



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba - Faculdade de Odontologia

**JULIANA DE AGUIAR SILVEIRA MEIRA**

**Análise do reparo alveolar em diferentes condições de estropausa induzida associada ao uso de montelucaste de sódio em camundongos C57BL/6: ênfase nas alterações morfológicas de osteoclastos nos diferentes modelos**

**Araçatuba - SP  
2026**

**JULIANA DE AGUIAR SILVEIRA MEIRA**

**Análise do reparo alveolar em diferentes condições de estropausa induzida associada ao uso de montelucaste de sódio em camundongos C57BL/6: ênfase nas alterações morfológicas de osteoclastos nos diferentes modelos**

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

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial

Orientador(a): Prof<sup>a</sup> Associada Mariza Akemi Matsumoto

Coorientador(a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia Cristina Biguetti

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M514a Meira, Juliana de Aguiar Silveira.  
Análise do reparo alveolar em diferentes condições de estropausa induzida associada ao uso de montelucaste de sódio em camundongos C57BL/6 / Juliana de Aguiar Silveira Meira. – Araçatuba, 2026  
59 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba

Orientadora: Profa. Mariza Akemi Matsumoto  
Coorientadora: Profa. Cláudia Cristina Bigueti

1. Camundongos 2. Insuficiência ovariana primária  
3. Leucotrienos 4. Osteoclastos I. T.

Black D7  
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedico este trabalho à Deus, a  
minha família, meu namorado e  
amigos ...

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecer em palavras segue sendo um desafio em meio a tanto o que ser grata, dessa forma, tento agradecer diariamente por meio do carinho, da presença e das orações. Com poucas palavras, tento expressar um pouco da gratidão de tudo aquilo que fez esse trabalho ser consolidado:

**À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** – Código de Financiamento 001, pela concessão de bolsa do nível de mestrado durante o período de 2024-2026.

**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. Bem como a todos os funcionários e professores.

**À Deus,** por ser meu suporte diário. Agradeço por ter me dado força todas as vezes que enfraqueci; me dado sabedoria nos momentos de desespero; ter sido meu guia nos momentos difíceis; por me ouvir calmamente todos os dias e responder através do acalento no coração, obrigada por permitir uma vida tão boa e tão cheia de bençãos.

**Aos meus pais, Vanusa de Aguiar Meira e Francisco Silveira Meira** que são meus maiores fãs, incentivadores e exemplos de vida. Obrigada por me ensinarem sobre o amor de forma tão genuína, por terem trabalhado tão duro para minha formação e concretização dos meus sonhos, esse é mais um sonho que só acontece porque tenho vocês! Agradeço por acreditarem em mim mais do que eu mesma. O amor de vocês é a prova do amor de Deus. Amo vocês.

**Ao meu irmão, Lucas de Aguiar Silveira Meira,** que mesmo tendo aspirações e personalidade tão diferente às minhas é minha metade na terra. Obrigada por ser minha companhia, por ser meu motivo de querer continuar crescendo e sendo exemplo para você e mais do que isso, por ser meu orgulho diário. Quero que seu caminho seja repleto de sonhos alcançados, de felicidade e de amor. Meu desejo é que seu sucesso seja ainda maior do que o sucesso que eu possa esperar para mim, afinal, te ver vencer já representa minha vitória. Te amo!

**Ao meu namorado, Lucas Ferreira Santos**, por me fazer ver a vida de forma diferente, por me permitir um amor recíproco e tão leve. Obrigada por fazer meus dias mais completos e felizes, por encarar novos hobbies só para me acompanhar, por sair da zona de conforto para me ver feliz. Obrigada pelas corridas, comidas, filmes, cultos e missas, passeios, descansos e treinos, por apreciar comigo o nascer do sol e o pôr do sol. Obrigada por ver a força em mim e por confiar tanto no meu potencial, você faz parte dessa e de tantas outras conquistas. Sou grata por sentir sua admiração através do seu olhar, suas palavras e seus gestos. Te amo!

Aos **familiares**, pelo amor, suporte, carinho e pelos bons momentos compartilhados. Obrigada por andarem comigo no caminho da vida guiando meus passos e me protegendo através das orações. À tia **Patrícia Aguiar**, obrigada por ser exemplo de força e de fé, meu coração se acalenta com sua presença. À **tia Magna**, obrigada por deixar a vida tão mais leve e divertida, ser exemplo de garra e criatividade, sou grata por ser sua sobrinha e aprender e me divertir tanto com você, você me inspira. Ao tio **Leandro Aguiar**, obrigada por me ajudar tantas e tantas vezes e obrigada pelo carinho desde sempre, sua sabedoria e trajetória me inspiram. À minha avó, **Isabel Aguiar**, agradeço que por meio da sua força foi possível criar tão bem a família, nos estruturando como pessoas de bem e nos tornando vencedores. As minhas madrinhas, **Creuza e Carmen**, obrigada por terem me fortalecido na fé e compaixão, mas também por nunca medirem esforços para me agradarem, obrigada pelo carinho. Aos meus tios e tias paternos, em especial ao **tio Miguel, Tio zé, Tio Pedro, Tia Laide, Tia Mani, Tia Nizia** obrigada por fazer minha infância cheia de vida! Aos meus primos, em especial a **Ingrid, Vinícius e Guilherme**, por partilharem tantas brincadeiras e conversas. Aos meus **avós paternos**, que partiram desse mundo deixando um legado de amor e fé, obrigada por unir a família sempre com tanta alegria e com tantas comidas gostosas repletas de carga emocional, agradeço por ter sido tão amada por vocês.

Aos **meus cachorros, Thor e Mel** que refletem a forma de amor mais puro. Vocês curam a ansiedade e preenchem a vida. Obrigada por me ensinarem diariamente sobre o amor e fazer meus dias muito mais felizes.

A todos os **professores** que passaram na minha vida, vocês me permitiram chegar aqui e me apaixonar pelo ensino e aprendizado. Obrigada por construírem uma sociedade melhor. Agradeço em especial o maior exemplo da profissão que eu tenho,

**minha mãe**, que é uma ótima professora dentro e fora de casa, admiro o quanto ama sua profissão e faz isso com tanto cuidado, você me ensina todos os dias, muito mais do que aquilo que a teoria poderia me ensinar. Agradeço também a minha mãe da ciência, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariza Akemi Matsumoto** que me acolheu e me deu tantas oportunidades, agradeço por toda orientação e conhecimento compartilhado durante esses anos desde a iniciação científica, até o mestrado e se Deus permitir, ainda tenho muito o que aprender e compartilhar com você nos próximos anos. Aproveito para dizer o quanto sou admiradora da sua forma de trabalho, organização e inteligência e que indo muito além, você é uma grande mãe e amiga que terei a honra de guardar no coração; **Ao professor Dr. Rafael Ortiz** que emana calma e é uma grande inspiração como pessoa e profissional, só quem teve a oportunidade de conviver ao menos um pouco com você sabe da luz que irradia de você, sua inteligência é cativante. **Ao professor Dr. Leonardo Perez Faverani**, pelos inúmeros ensinamentos em aula e fora dela, você é uma inspiração e referência para mim, obrigada também pela amizade. **À professora Dra. Ana Paula Bassi**, por ser uma referência de cirurgiã, obrigada por ser acolhedora e por ter me ensinado muito mais do que técnicas cirúrgicas. Obrigada pelas oportunidades e conversas. **À professora Dra. Roberta Okamoto**, por me acolher tão bem na pós-graduação e por ser um grande exemplo de pesquisadora. **À professora Dra. Alaide**, agradeço por compartilhar bons momentos e por descomplicar a vida, obrigada pela alegria que contagia. **Ao professor Dr. Edilson Ervolino**, pela paciência, ensinamentos, por toda ajuda em tantos experimentos e por sempre acolher e integrar os alunos de forma tão genuína. Você é um ser humano e pesquisador admirável. **Ao Professor Dr. Antônio Hernandez**, por toda simpatia e acolhimento, obrigada por compartilhar tantos horários de almoço e sempre se preocupar com nosso bem-estar e planos. Você mostra que a construção da pós-graduação vai além da faculdade. **Ao professor Dr. André Fabris** por criar um ambiente acolhedor nos plantões, tirando um pouco o peso da rotina cansativa e medos quanto ao ambiente novo, obrigada por deixar a experiência mais leve e mesmo assim permitir tanta oportunidade de aprendizado.

**Ao meu grupo de pesquisa do Departamento de Ciências Básicas**, por ajudarem não só nessa pesquisa, mas também por agregar no meu dia a dia. Obrigada por todas as trocas de aprendizados, todas as conversas e companhias, sou



muito grata pelas amizades que construí aqui dentro. Em especial a **Carol Bacelar**, ser humano único, iluminado e com uma calma e inteligência admirável, que me ensina muito todos os dias e que nunca mede esforços para ajudar, obrigada por me deixar participar em momentos tão importantes na sua vida, como seu casamento; obrigada por dividir a bancada de laboratório e de estudos comigo; por fazer os dias de imuno muito mais tranquilos e por ser minha companheira do mestrado. Agradeço também ao **Caio Jesus e Gabi Avante**, pela amizade que se estende além das barreiras da faculdade, foi um prazer ver o quanto vocês vêm crescendo como estudantes e pesquisadores. Muito obrigada pelos dias de academia, spinning, comilanças e conversas, foram muitas risadas trocadas que ficarão no coração. **À Ana Júlia**, por confiar em mim, me incentivar e proporcionar momentos de reflexão. Aos demais pesquisadores do ORAL, obrigada por tornar um ambiente gostoso de estar.

**Aos meus amigos**, que ao longo da vida me moldaram e se fizeram presentes, obrigada por partilhar a vida. Em especial, aos amigos que fiz em Araçatuba e se fizeram minha família aqui, muito obrigada por terem sido lar.

**À Carol Becher e Arthurzinho**, obrigada por me ensinarem sobre resiliência, força e amizade. Carol, foi um prazer dividir apartamento com você por tantos anos, obrigada por ter me dado a oportunidade de te admirar como mulher, pesquisadora e agora como mãe. Obrigada por ter me dado tantas oportunidades e claro por ter me apresentado o Lucas, você é como uma irmã mais velha para mim, sinto muito orgulho de vocês.

**Ao Arthur Viotto**, que sinceramente nem sei por onde começar agradecer, você fez tanto por mim ao longo desses tantos anos de amizade. Obrigada por ter estado nos bons e maus momentos, por me fazer rir mesmo em dias difíceis. Sua fé e sua alegria contagiam e inspiram. Tenho muita admiração pelo profissional e ser humano que você é, desejo que conquiste o mundo!

**Ao Vitor Hugo**, sinto saudade de você todos os dias, você é e sempre vai ser minha eterna dupla de faculdade e essa parceria se estende para a vida. Obrigada por ter sido companhia e suporte, me ensinado e me cobrado do seu jeitinho delicado de ser. Você me fez uma estudante muito melhor, me ajudou sonhar e guiou meus passos na graduação. Fico imensamente feliz em ver seu sucesso, mesmo que agora a alguns km de distância.

**À Samyra**, pessoa mais nostálgica e criativa que eu conheço. Você tem um dom inexplicável do cuidado com o próximo, sou muito grata por ter sentido isso ao seu lado. Obrigada por todas as conversas, risadas e comidas. Foi e segue sendo bom demais dividir a vida com você.

**À Gabriela Baccaro**, que mesmo distante se faz presente, obrigada por torcer e acreditar em mim, sinto sua falta!

**À Nataira**, obrigada por ter sido minha mentora e amiga durante a iniciação e me ouvido sempre com calma e dando os melhores conselhos. A decisão de fazer o mestrado veio em grande parte das nossas conversas e do quanto você acreditou que eu seria capaz. Obrigada por ainda se fazer presente mesmo a distância e com a vida tão conturbada, fico muito feliz que esteja também nesse momento tão importante da minha vida, te admiro e torço muito por você.

**À Bárbara**, obrigada por refletir o amor de Deus através do cuidado que tem com as pessoas e mais do que isso, por refletir isso na sua profissão. Agradeço a Deus por ter te colocado no meu caminho, é um prazer poder te admirar e me inspirar em você mais de perto. Sou extremamente feliz e grata por todas as oportunidades que me deu e vem me dando, meu crescimento como profissional e pessoa também está ligado a você e essa amizade que viemos construindo.

**À Fabiana Moreira**, que cresceu se fazendo presente. Obrigada por todos os anos de amizade, sinto orgulho do tanto que te vi crescer. Atualmente, apesar dos nossos encontros serem mais esporádicos, ainda é como se não houvesse distância, continuo me sentindo a vontade na sua vida. Obrigada pelas nossas corridas e pelos muitos litros de tereré com conversas jogadas fora.

**Aos amigos da pós-graduação** por tornar essa jornada muito mais enriquecedora e feliz. Em especial a **Ynara, Mateus Torres, Matheus, Mel, Iza Delamura, Iza Sol, Camila Cerantula, Leticia, Ana Paula, Fran e Maria Eduarda** por compartilhar bons momentos e dividir seus sonhos. Vocês são especiais!

*“Nada do que vivemos tem sentido se  
não tocarmos o coração das pessoas”*

**Cora Carolina**

## RESUMO

MEIRA, J. A. S. **Análise do reparo alveolar em diferentes condições de estropausa induzida associada ao uso de montelucaste de sódio em camundongos C57BL/6: ênfase nas alterações morfológicas de osteoclastos nos diferentes modelos.** 2026. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2026.

A deficiência estrogênica associada à menopausa interfere diretamente no metabolismo ósseo, comprometendo o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea. Além dos mecanismos hormonais clássicos, mediadores inflamatórios e lipídicos, como os eicosanoides atuam sobre o metabolismo ósseo. Nesse contexto, a via dos leucotrienos destaca-se pelo seu caráter predominantemente catabólico sobre o tecido ósseo. Dessa forma, inibidores dos cisteinil-leucotrienos (cisLTs) como o Montelucaste de sódio (MTK) agem como alternativa farmacológica para modular essa via. Modelos animais de falência ovariana precoce (FOP), como a ovariectomia (OVX) e o uso do diepóxido 4-vinilciclohexeno (VCD), permitem a investigação dos mecanismos envolvidos nesse processo e podem repercutir em diferenças na construção trabecular, bem como na morfologia osteoclástica. Assim, o presente estudo teve como objetivo comparar a interferência dos modelos de estropausa em camundongos por OVX e uso de VCD, tratados ou não com montelucaste de sódio no processo de reparo alveolar pós-exodontia, com especial ênfase na caracterização dos osteoclastos e do microambiente ósseo. Para tanto, foram utilizados 30 camundongos C57BL/6J fêmeas com idades de 4 e 6 meses, divididas em grupos de acordo com os tratamentos: Controle (sem tratamento), OVX- submetida à ovariectomia (OVX), VCD- tratadas com diepóxido 4-vinilciclohexeno (VCD) na dose de 160mg/kg via IP por 20 dias consecutivos, MTK- tratadas com MTK na dose de 2mg/kg, OVX+MTK- submetidas à OVX e medicadas com MTK, VCD+MTK- tratadas com VCD e MTK. Após a confirmação do diestro permanente, realizou-se a exodontia do incisivo superior direito, com eutanásia aos 30 dias. As maxilas foram analisadas por microtomografia computadorizada, histologia em HE, imuno-histoquímica e coloração por Picrosirius Red. Os resultados obtidos foram submetidos aos testes estatísticos considerando-se nível de significância de 5%. De modo geral, todos os alvéolos foram preenchidos por tecido ósseo recém-formado, embora tenham apresentado diferenças na organização estrutural, maturação da matriz e

comportamento osteoclástico. O modelo OVX promoveu maior comprometimento da microarquitetura óssea e alterações morfológicas mais evidentes nos osteoclastos, enquanto o modelo VCD apresentou padrão mais próximo ao controle. O tratamento com montelucaste de sódio não impactou de forma relevante a formação óssea, porém apresentou diferença na organização da matriz colagênica, resultando em osso quantitativamente semelhante ao controle, mas com menor grau de maturação estrutural no período avaliado. Conclui-se que os diferentes modelos de estropausa induzida interferem no reparo alveolar pós-exodontia de maneira distinta, sendo que o OVX compromete a organização trabecular, reduz o volume ósseo e altera a morfologia osteoclástica, enquanto o VCD apresenta menor impacto no reparo ósseo. O uso do MTK mostrou influência mais evidente sobre a organização tecidual e a matriz colagênica do que sobre parâmetros quantitativos da formação óssea. Além disso, os resultados sugerem que, na dose utilizada, o MTK modula preferencialmente a atividade osteoclástica do que à fusão celular.

**Palavras-chave:** camundongos; insuficiência ovariana primária; leucotrienos; osteoclastos.

## ABSTRACT

MEIRA, J.A.S. **Analysis of alveolar repair in different conditions of induced estropause associated with the use of montelukast sodium in C57BL/6 mice: emphasis on morphological changes in osteoclasts in the different models.** 2026. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2026.

Estrogen deficiency associated with menopause directly interferes with bone metabolism, compromising the balance between bone formation and resorption. In addition to classical hormonal mechanisms, inflammatory and lipid mediators, such as eicosanoids, act on bone metabolism. In this context, the leukotriene pathway stands out due to its predominantly catabolic effect on bone tissue. Thus, cysteinyl-leukotriene (cisLT) inhibitors, such as montelukast sodium (MTK), act as a pharmacological alternative to modulate this pathway. Animal models of premature ovarian failure (POF), such as ovariectomy (OVX) and the use of 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD), allow investigation of the mechanisms involved in this process and may result in differences in trabecular architecture as well as osteoclastic morphology. Therefore, the present study aimed to compare the interference of estropause models in mice induced by OVX and VCD administration, treated or not with montelukast sodium, in the post-extraction alveolar repair process, with special emphasis on the characterization of osteoclasts and the bone microenvironment. For this purpose, 30 female C57BL/6J mice aged 4 and 6 months were used and divided into groups according to treatment: Control (no treatment); OVX – subjected to ovariectomy (OVX); VCD – treated with 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) at a dose of 160 mg/kg via intraperitoneal (IP) administration for 20 consecutive days; MTK – treated with MTK at a dose of 2 mg/kg; OVX+MTK – subjected to OVX and treated with MTK; VCD+MTK – treated with VCD and MTK. After confirmation of permanent diestrus, the right maxillary incisor was extracted, and euthanasia was performed at 30 days. The maxillae were analyzed by micro-computed tomography, hematoxylin and eosin (H&E) histology, immunohistochemistry, and Picrosirius Red staining. The results obtained were subjected to statistical tests considering a significance level of 5%. In general, all alveoli were filled with newly formed bone tissue, although differences were observed in structural organization, matrix maturation, and osteoclastic behavior. The OVX model promoted greater impairment of bone microarchitecture and more evident

morphological alterations in osteoclasts, whereas the VCD model exhibited a pattern closer to the control group. Treatment with montelukast sodium did not significantly impact bone formation; however, differences were observed in collagen matrix organization, resulting in bone quantitatively similar to the control group but with a lower degree of structural maturation during the evaluated period. It can be concluded that the different models of induced estropause interfere distinctly with post-extraction alveolar repair, with OVX compromising trabecular organization, reducing bone volume, and altering osteoclastic morphology, while VCD presents a lesser impact on bone repair. The use of MTK showed a more evident influence on tissue organization and collagen matrix than on quantitative parameters of bone formation. Furthermore, the results suggest that, at the dose used, MTK preferentially modulates osteoclastic activity rather than cell fusion.

**Keywords:** mice; primary ovarian insufficiency; leukotrienes; osteoclasts.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Sequenciamento cirúrgico de ovariectomia realizado nos grupos OVX e OVX-MTK. (A) Tricotomia unilateral; (B) Incisão de acesso por planos; (C) Tracionamento da almofada de gordura ovariana e delimitação com nó estéril para remoção dos ovários; (D) Síntese do tecido com pontos simples em Nylon 5-0 28
- Figura 2** - Coleta de citologia vaginal, realizada em todos os grupos. (A) Lavagem vaginal com solução salina; (B) Aposição do fluido vaginal em lâmina para posterior análise 28
- Figura 3** - Tratamento farmacológico com MTK nos grupos MTK, OVX-MTK e VCD-MTK. (A) Agitação para homogeneização do MTK antes da administração diária; (B e C) Administração de 10µl de MTK via oral com auxílio de uma pipeta 29
- Figura 1** - Procedimento de exodontia realizado em todos os grupos experimentais. (A) Avaliação clínica inicial; (B) Divulsão dos tecidos peri-dentais com auxílio de uma micro lâmina de bisturi ao redor do incisivo superior direito; (C) Luxação com sonda explorado 30
- Figura 2** - Linha do tempo referente aos procedimentos realizados nos grupos controle, OVX, VCD, MTK, OVX-MTK e VCD-MTK 31
- Figura 6** - Fluxo de trabalho executado para escaneamento e análise dos alvéolos. 32
- Figura 7** - Reconstrução axial dos alvéolos escaneados em MicroCT aos 30 dias dos grupos Controle, OVX, VCD, MTK, OVX-MTK e VCD-MTK. 36
- Figura 8** - Análise quantitativa alveolar em microCT. Análise referentes aos parâmetros (A) BV/TV% (B) Tb.Th (C) Tb.N e (D) Tb.Sp. 37



<b>Figura 9</b> - Representação da análise qualitativa dos grupos Controle, OVX, VCD, MTK, OVX-MTK e VCD-MTK em menor aumento (4x)	39
<b>Figura 10</b> - Aspectos histopatológicos dos alvéolos em reparação dos grupos Controle, OVX, VCD, MTK, OVX-MTK e VCD-MTK.	40
<b>Figura 11</b> - Análise de birrefringência das fibras colágenas em alvéolos dentários pós-extração: imagens representativas sob luz polarizada e quantificação das fibras verdes, vermelhas e totais.	41
<b>Figura 12</b> - Marcação imuno-histoquímica para os anticorpos: NFATc1; DC-STAMP e TRAP	41
<b>Figura 13</b> - Representação gráfica da análise quantitativa dos anticorpos: NFATc1; DC-STAMP e TRAP	43

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Distribuição dos animais pertencentes aos grupos Controle, OVX, 26  
VCD, MTK, OVX-MTK E VCD-MTK

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	PORCENTAGEM
µg/Kg	MICROGRAMA POR QUILO
µl	MICROLÍTRO
5LO	5-LIPOXIGENASE
5LOKO	5 LIPOXIGENASE KNOCKOUT
AA	ÁCIDO ARAQUIDÔNICO
BV	VOLUME ÓSSEO
BV/TV	VOLUME ÓSSEO EM RELAÇÃO À QUANTIDADE TOTAL
CEUA	COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CisLTR1	CISTEINIL LEUCOTRIENOS 1
CisLTR2	CISTEINIL LEUCOTRIENOS 2
CisLTs	CISTEINIL LEUCOTRIENOS
c-KIT	RECEPTOR DE TIROSINA QUINASE KIT
cm	CENTÍMETROS
CONCEA	CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
COX	CICLOOXIGENASE
DMO	DENSIDADE MINERAL ÓSSEA
DP	DESVIO PADRÃO
EDTA	ETILENODIAMINOTETRACÉTICO
FLAP	PROTEÍNA ATIVADORA DE 5-LIPOXIGENASE
FOP	FALÊNCIA OVARIANA PREMATURA
FSH	HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE
IL	INTERLEUCINA
IP	INTRAPERITONEAL
LO	LIPOXIGENASE
LTB4	LEUCOTRIENO B4
Mg/dL	MILIGRAMAS POR DECILITRO
mg/Kg	MILIGRAMA POR QUILO
microCT	MICROTOMOGRÁFIA
mm	MILÍMETROS

MTK	MONTELUCASTE
N	NÚMERO DA AMOSTRA
oC	GRAUS CÉLCIUS
OVX	OVARIECTOMIA
P	PROBABILIDADE DE SIGNIFICÂNCIA
PVPI	POLIVINIL PIRROLIDONA IODO DEGERMANTE
RANKL	LIGANTE DO RECEPTOR ATIVADOR DO FATOR NUCLEAR KAPPA-B
SUS	SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE
Tb.N	NÚMERO DE TRABÉCULAS
Tb.Sp	SEPARAÇÃO DE TRABÉCULAS

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVO	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Aspectos Éticos	25
3.2 Modelo Experimental	25
3.3 Delineamento Experimental	25
3.4 Tratamento Farmacológico com VCD	26
3.5 Procedimento Cirúrgico para Ovariectomia	26
3.6 Avaliação da Citologia Vaginal Diária	28
3.7 Tratamento Farmacológico com MTK	29
3.8 Procedimento Cirúrgico para Exodontia	29
3.9 Eutanásia dos Animais e Coleta dos Espécimes	30
3.10 Análise morfológica tridimensional por microCT	31
3.11 Procedimentos histotécnicos	32
3.12 Análise Histológica Qualitativa	33
3.13 Técnica Imuno-Histoquímica	33
3.14 Análise Imuno-Histoquímica	34
3.15 Procedimentos Histotécnicos para Análise de Birrefringência	34
3.16 Análises Estatísticas	35
4 RESULTADOS	36
4.1 Análise Microtomográfica	36
4.2 Análise de Histológica	38
4.3 Análise de birrefringência	40
4.4 Análise imuno-histoquímica	41
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXOS	56

## 1 INTRODUÇÃO

O processo de remodelação é o ponto chave da homeostase óssea, uma vez que a partir dele ocorre a formação de um novo tecido ósseo. Dessa forma, micro danos são constantemente reparados, além de haver adaptações à cargas mecânicas, bem como a disponibilização de reservas de íons como o cálcio para o organismo. Para que isso ocorra, os eventos de reabsorção e formação precisam estar coordenados (Omi; Mishina, 2022). Esse processo envolve a ação dos osteoclastos, que realizam o processo de reabsorção da matriz mineralizada, dos osteoblastos, responsáveis pela deposição da matriz orgânica óssea possibilitando sua mineralização, das células de revestimento ósseo e osteócitos que são cruciais para a manutenção do tecido, percepção de esforço e controle do processo de remodelação (Crockett *et al.* 2011; Schaffler *et al.*, 2013; Wein, 2017).

O equilíbrio entre a reabsorção e formação óssea se dá por fatores locais e sistêmicos (Siddiqui; Partridge, 2016), sendo o estrogênio um dos principais reguladores de ordem sistêmica, uma vez que esse hormônio tem efeito direto sobre as células ósseas, aumentando a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais e a maturação dos osteoblastos, melhorando assim a formação óssea. Além disso, inibe a formação e induz a apoptose de osteoclastos, o que limita a reabsorção óssea (Börjesson *et al.*, 2013). Sabe-se que o estrogênio também interage com várias células do sistema imunológico, levando a um fenótipo pró-inflamatório crônico de baixo grau sob deficiência de estrogênio. Pensando no ideal da osteoimunologia, é razoável supor que a perda óssea após a menopausa se deva em parte à interação entre as células imunológicas e o metabolismo ósseo (Fischer; Haffner-Luntzer, 2022).

Em nível celular, vários mecanismos contribuem para a perda óssea relacionada à deficiência de estrogênio. De forma prática, a deficiência de estrogênio aumenta a reabsorção óssea que pode resultar em osteoporose, além de aumentar a secreção de IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF), destacando sua relação com a resposta imune. Apesar da sua deficiência, estar relacionada ao evento da pós-menopausa por envelhecimento natural na mulher (Cheng; Chen; Chen, 2022), outras condições também podem levar à este quadro, como a necessidade de remoção

cirúrgica dos ovários pela presença de doenças e tumores, bem como tratamentos adjuvantes como a radioterapia (Cox; Liu, 2014).

O mecanismo pelo qual o estrogênio regula a atividade osteoclástica ainda não é totalmente elucidado, uma possibilidade é que direta ou indiretamente a deficiência de estrogênio aumente a produção de RANKL (promotor de diferenciação e ativação de osteoclastos), em diversas populações de células do microambiente ósseo, incluindo osteócitos e células da linhagem osteoblástica, além de diminuir a apoptose dos osteoclastos (Khosla; Monroe, 2017). Há também evidências consideráveis de estudos em humanos de que o estrogênio regula a produção do inibidor da sinalização Wnt, a esclerostina. A esclerostina modula não apenas a formação óssea, mas também a reabsorção óssea (Drake; Khosla, 2017; Tu *et al.*, 2015). Essas evidências confirmam abordagens terapêuticas usadas no tratamento da osteoporose. De forma notória, o aumento da reabsorção óssea em mulheres na pós-menopausa pode agora ser totalmente revertido clinicamente pelo tratamento com Denosunab, um anticorpo monoclonal para RANKL (Cummings *et al.*, 2009). De forma semelhante, a inibição da esclerostina pelo anticorpo monoclonal Romosozumab resulta em um aumento na formação óssea e redução na reabsorção óssea em mulheres pós-menopausa (Cosman *et al.*, 2016).

Além da melhora da densidade mineral óssea (DMO) durante a suplementação com estrogênio ser uma evidência positiva da relação do estrogênio com o metabolismo ósseo, estudos que tiram a variável idade também são fortes indicadores. Isso porque, de fato o envelhecimento aumenta a reabsorção e fragilidade óssea (Milovanovic *et al.*, 2015). Contudo, estudos em pacientes com falência ovariana prematura (FOP) revelaram menor DMO e risco aumentado de fraturas em relação a mulheres que desenvolveram osteoporose por outras razões além da FOP (como hipotireoidismo, tratamento com esteróides, hiperparatireoidismo) (Jankowska, 2017).

A atual preocupação se dá devido à crescente expectativa média de vida da população mundial nos últimos anos (Partridge; Deelen; Slagboom, 2018), observando-se um perfil de pacientes mais velhos em busca de procedimentos estéticos e funcionais, como a reabilitação bucal com implantes osseointegráveis. Estudos retrospectivos mostraram que, somente na última década 143.037 implantes dentários foram fornecidos pelo sistema público de saúde brasileiro (SUS) (Kinalski *et*

*al.*, 2020). Considerando a população feminina, esses dados têm ainda mais impacto, visto que apresentam maior incidência de osteoporose quando comparado aos homens, resultado de eventos da peri e pós-menopausa em que se observa uma queda significativa do hormônio estrogênio pela falência natural dos ovários (Koebele; Bimonte-Nelson, 2016). Embora os homens também desenvolvam osteoporose com o envelhecimento, falta-lhes a cessação abrupta da função gonadal presente nas mulheres (Khosla; Monroe, 2017). Por tal relevância, muitos estudos se propuseram a entender se a osteoporose é um fator de risco para procedimentos odontológicos, principalmente considerando o impacto da osseointegração de implantes e reparo pós exodontia. Para isso, o estudo em murinos tem sido amplamente utilizado, onde destaca-se a ovariectomia (OVX) como modelo experimental mais utilizado de osteoporose pós-menopausa, sendo um método que consiste na remoção cirúrgica bilateral dos ovários dos animais (Sophocleous; Idris, 2019). Esse modelo apresenta uma diminuição dramática na massa óssea e na DMO, além de induzir a perda óssea alveolar (Liu *et al.*, 2019).

Contudo, diferente do que ocorre na OVX, a menopausa fisiológica humana não é um evento abrupto (Koebele; Bimonte-Nelson, 2016). Além disso, há a permanência dos órgãos reprodutores, de forma que os níveis séricos de testosterona e outros andrógenos não mudam significativamente na menopausa (Handelsman; Sikaris; Ly, 2015), o que não ocorre no modelo de OVX. O declínio dos níveis séricos de estradiol e o aumento concomitante nos níveis séricos do hormônio folículo estimulante [FSH] durante a menopausa estão intimamente relacionados a um aumento da atividade de reabsorção óssea (Sowers *et al.*, 2013). Então, apesar da popularidade da OVX nos estudos, biologicamente esse modelo não seria o mais fiel ao da menopausa fisiológica, por apresentar perfil hormonal consideravelmente diferente; no entanto, apresenta muita similaridade à menopausa cirúrgica em mulheres (Koebele; Bimonte-Nelson, 2016).

Sabe-se que os mamíferos nascem com uma fonte limitada de células germinativas e durante os ciclos reprodutivos ocorre o desenvolvimento folicular, partindo do estágio mais imaturo, denominado de primordial, e os folículos que não sofrem morte celular por atresia nessa fase, se desenvolvem em primário e seguem em desenvolvimento até a ovulação. A atresia folicular acontece constantemente no ovário desde o nascimento até que a reserva de folículo se esgote. Uma vez que o



ovário fica sem folículos primordiais ocorre a falência ovariana, denominada menopausa (Brooks; Pollow; Hoyer, 2016).

Dessa forma, um modelo experimental que reproduzisse a transição progressiva para menopausa passou a ser investigado, com o uso do produto químico 4-vinilciclohexeno diepóxido (VCD). Sua ação permite mimetizar o período de menopausa humana natural, ocasionando ciclos irregulares com oscilação entre períodos de alto e de baixo estrogênio, além de uma queda contínua desse hormônio condizente ao período da menopausa (Brooks; Pollow; Hoyer, 2016; Kappeler; Hoyer, 2012; Santoro *et al.*, 1996). Esta droga apresenta toxicidade específica para os folículos primordiais e primários, esgotando o ovário por meio de atresia acelerada. Os folículos secundários e antrais restantes são reduzidos em número durante os ciclos seguintes até que o ovário esteja esgotado. Além disso, o tecido ovariano restante continua produzir andrógenos, semelhante ao que ocorre na menopausa fisiológica (Brooks; Pollow; Hoyer, 2016). Para que se alcance estes resultados, o VCD precisa ser administrado diariamente por uma média de 20 dias consecutivos, onde vai agir inibindo diretamente a autofosforilação do receptor de sobrevivência c-kit, localizado na membrana plasmática do oócito (Mark-Kappeler *et al.*, 2011). Em um estudo prévio usando o VCD foi observado que a perda folicular ocorre de forma mais grave nos camundongos do que nos ratos (Liu *et al.*, 2015). Além da maior sensibilidade pelo VCD, os camundongos apresentam outras vantagens no ramo da pesquisa, pois desenvolvem patologias com as mesmas susceptibilidades genéticas dos humanos (Timmermans; Van Montagu; Libert, 2017), somado ao fato de que o pequeno tamanho do animal facilita o uso de quantidades reduzidas de medicamentos e períodos experimentais (Vandamme, 2014).

Apesar do uso do VCD já estar bem consolidado e apresentar-se seguro para uso em laboratório (Liu *et al.*, 2015), ainda há uma escassez de estudos que avaliem o seu efeito no reparo ósseo alveolar. No entanto, é importante essa comparação entre ambos os modelos experimentais e seu impacto sobre o reparo alveolar, uma vez que, como observado, eles apresentam diferenças hormonais importantes que devem ser levadas em consideração na hora da escolha da metodologia do trabalho.

Por sua vez, destaca-se no cenário do metabolismo ósseo o papel dos osteoclastos, que são células multinucleadas derivadas da linhagem hematopoiética e possuem a capacidade de reabsorver a matriz óssea. Os osteoclastos ativados

formam uma zona de selamento circundado pela borda pregueada, que define a área da superfície óssea a ser reabsorvida (Omi; Mishina, 2022; Rucci; Teti et al., 2016). Para sua organização e posterior ativação, é necessário que ocorra um processo de fusão. Várias proteínas, como o fator nuclear de células T-ativadas (NFATc1) e a proteína transmembrana específica de células dentríticas (DC-STAMP) estão envolvidas nessa etapa de fusão e maturação dos osteoclastos (Feng et al., 2009; Levaot et al., 2015; Omi; Mishina, 2022; Soe et al., 2019; Zhao et al., 2010).

Notamos que esse processo pode repercutir de forma distinta nos diferentes modelos experimentais. Em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (FAPESP #2022/04676-8) observamos que a FOP causada pelo VCD parece exercer efeito diferente sobre o tecido ósseo neoformado tanto na morfologia trabecular, quanto na morfologia dos osteoclastos. Enquanto os osteoclastos observados no grupo OVX eram volumosos; no grupo VCD, semelhante ao grupo controle, eram mais alongados e menores. A partir disso, fomos instigados a entender as características que levam a essa diferença na fusão e morfologia osteoclástica.

Dessa forma, além dos fatores clássicos envolvidos na diferenciação e fusão osteoclástica, torna-se relevante considerar o papel de mediadores inflamatórios e lipídicos na regulação da morfologia e da atividade funcional dos osteoclastos. Nesse cenário os eicosanóides, derivados do ácido araquidônico (AA) pelas vias ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LO), conhecidos pelo seu papel na inflamação, apresentam um papel importante no metabolismo e reparo ósseo, mesmo que ainda pouco explorado (Bennett; Gilroy, 2016; Lisowska; Kosson; Domaracka, 2018).

Evidências reforçam que as COXs têm um papel anabólico sobre os osteoblastos, confirmando, portanto, seu papel positivo na neoformação óssea e adicionalmente sobre a angiogênese (Simon; O'Connor, 2007). Por outro lado, a enzima 5-LO, parece ter um papel mais decisivo sobre a osteoclastogênese, apresentando uma ação catabólica sobre o tecido ósseo (Manigrasso; O'Connor, 2010). O AA é metabolizado pelo 5-LO através de sua interação com uma proteína de membrana nuclear chamada proteína ativadora de 5-Lipoxigenase (FLAP), que resulta na produção de dois grupos principais de leucotrienos, LTB4 e os cisteinil leucotrienos (CisLTs). Os CisLTs atuam através de dois receptores que são acoplados à proteína G, CisLTR1 e CisLTR2. Uma das funções do CisLTR1 é a indução do sinal

intracelular de cálcio, que também regula a ativação de osteoclastos (Lee *et al.*, 2012; Peter-Golden; Henderson Júnior, 2007; Simon; O'Connor, 2007).

Nesse contexto, alguns estudos foram feitos em modelos murinos com deleção genética para enzima 5LO, e em um deles observou que em camundongos senescentes nocauteados para essa enzima (5LOKO) houve um melhor reparo intramembranoso quando comparado ao grupo selvagem (WT) (Mahmoud *et al.*, 2021). Assim, entendemos que a modulação desta via pode favorecer o reparo ósseo. Para transpor esses mesmos efeitos em humanos, o uso de drogas antileucotrienos parece ser uma boa alternativa. O montelucaste de sódio (MTK) é um antagonista do CisLTR1 eficaz para o tratamento de doenças das vias aéreas superiores, especialmente asma brônquica (Bousquet; Demoly; Humbert, 2009). No entanto também age no metabolismo ósseo (Zheng; Shi, 2018). Um estudo prévio, realizado em modelo animal, mostrou que o MTK influenciou na morfologia dos osteoclastos, evidenciando as células TRAP+ arredondadas e menores, diferentes do grupo controle. Ainda nesse trabalho, os resultados mostraram que o MTK promoveu a formação óssea precoce após a extração dentária e aumentou a formação óssea final quando em maior dose (Ribeiro *et al.*, 2023).

Diante do exposto, nos propomos comparar o reparo alveolar pós-exodontia em diferentes modelos de falência ovariana precoce induzida em camundongos, por ovariectomia (OVX) e pelo uso de VCD, associados ou não ao tratamento com o montelucaste de sódio. Considerando o papel central dos osteoclastos na remodelação óssea e a influência de mediadores inflamatórios e lipídicos sobre sua ativação e morfologia.

## **6 CONCLUSÃO**

Conclui-se que os diferentes modelos de estropausa induzida interferem no reparo alveolar pós-exodontia de maneira distinta, sendo que o OVX compromete a organização trabecular, reduz o volume ósseo e altera a morfologia osteoclástica, enquanto o VCD apresenta menor impacto no reparo ósseo.

O uso do MTK mostrou influência mais evidente sobre a organização tecidual e a matriz colagênica do que sobre parâmetros quantitativos da formação óssea. Além disso, os resultados sugerem que, na dose utilizada, o MTK modula preferencialmente a atividade osteoclástica do que à fusão celular.

## REFERÊNCIAS

- BACELAR, A. C. Z. *et al.* Aged and induced-premature ovarian failure mouse models affect diestrus profile and ovarian features. **PLoS One**, v. 18, n. 12, e0284887, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0284887>.
- BACELAR, A. C. Z. *et al.* Influence of different post estropausal models on dental socket repair, bone metabolism, and antioxidant capacity of C57Bl/6 J mice. **Odontology**. 2025. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10266-025-01134-0>. In press.
- BENNETT, M.; GILROY, D. W. Lipid mediators in inflammation. **Microbiol. Spectr.**, v. 4, n. 6, p. 1–21, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0035-2016>.
- BIGUETTI, C. C. *et al.* Influence of age and gender on alveolar bone healing post tooth extraction in 129 Sv mice: a microtomographic, histological, and biochemical characterization. **Clin. Oral Investig.**, v. 27, n. 8, p. 4605–4616, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-023-05087-y>.
- 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, n. 6, p. e0214173, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0214173>.
- BÖRJESSON, A. E. *et al.* The role of estrogen receptor  $\alpha$  in the regulation of bone and growth plate cartilage. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 70, n. 21, p. 4023–4037, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-013-1317-1>.
- BOUSQUET, J.; DEMOLY, P.; HUMBERT, M. Montelukast in guidelines and beyond. **Adv. Ther.**, v. 26, n. 6, p. 575–587, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12325-009-0038-1>.
- BOUXSEIN, M. L. *et al.* Ovariectomy-induced bone loss varies among inbred strains of mice. **J. Bone Miner. Res.**, v. 20, n. 7, p. 1085–1092, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1359/JBMR.050307>.
- BROOKS, H. L.; POLLOW, D. P.; HOYER, P. B. The VCD mouse model 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: <http://dx.doi.org/10.1152/physiol.00057.2014>.

CHEN, C. H.; WANG, L.; TULU, U. S. et al. An osteopenic/osteoporotic phenotype delays alveolar bone repair. **Bone**, v. 112, p. 212–219, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.04.019>

CHENG, C. H.; CHEN, L. R.; CHEN, K. H. Osteoporosis due to hormone imbalance: an overview of the effects of estrogen deficiency and glucocorticoid overuse on bone turnover. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 23, n. 3, p. 1376, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23031376>.

Chiu YH, Ritchlin CT. DC-STAMP: A Key Regulator in Osteoclast Differentiation. **J Cell Physiol.** 2016 Nov;231(11):2402-7. doi: 10.1002/jcp.25389. Epub 2016 Jun 14. PMID: 27018136; PMCID: PMC4946985.

CORA, M. C.; 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.**, v. 43, n. 6, p. 776–793, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0192623315570339>.

COSMAN, F. *et al.* Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 375, n. 16, p. 1532–1543, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1607948>.

COX, L.; LIU, J. H. Primary ovarian insufficiency: an update. **Int. J. Womens Health**, v. 6, p. 235–243, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/IJWH.S37636>.

CROCKETT, J. C. *et al.* Bone remodelling at a glance. **J. Cell Sci.**, v. 124, pt. 7, p. 991–998, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.063032>.

CUMMINGS, S. R. *et al.* Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 361, n. 8, p. 756–765, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0809493>.

DRAKE, M. T.; KHOSLA, S. Hormonal and systemic regulation of sclerostin. **Bone**, v. 96, p. 8–17, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2016.12.004>.

EPSLEY, S. *et al.* The effect of inflammation on bone. **Front. Physiol.**, v. 11, p. 511799, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2020.511799>.

ERVOLINO E. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. **Bone**. 2019;120:101–113. doi:10.1016/j.bone.2018.10.014.

EVERTS, Vincent; VRIES, Teun J. de; HELFRICH, Miep H.. Osteoclast heterogeneity. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Basis Of Disease*, [S.L.], v. 1792, n. 8, p. 757-765, ago. 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.05.004>.

FENG, H. *et al.* Myocyte Enhancer Factor 2 and Microphthalmia-associated Transcription Factor Cooperate with NFATc1 to Transactivate the V-ATPase d2 Promoter during RANKL-induced Osteoclastogenesis. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 284, n. 21, p. 14667-14676, maio 2009. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m901670200>.

FISCHER, V.; HAFFNER-LUNTZER, M. Interaction between bone and immune cells: Implications for postmenopausal osteoporosis. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 123, p. 14–21, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.05.014>.

FUJITA, H.; *et al.*, Cysteinyl leukotriene receptor 1 is dispensable for osteoclast differentiation and bone resorption. **PLoS One**, v. 17, n. 11, e0277307, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0277307>

GALEA, G. L. *et al.* Making and shaping endochondral and intramembranous bones. **Dev. Dyn.**, v. 250, n. 3, p. 414–449, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.278>.

HANDELSMAN, D. J.; SIKARIS, K.; LY, L. P. Estimating age-specific trends in circulating testosterone and sex hormone-binding globulin. **Ann. Clin. Biochem.**, v. 53, n. 3, p. 377–384, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0004563215610589>.

HEISS, C. *et al.* Induction of osteoporosis with its influence on osteoporotic determinants and their interrelationships in rats by DEXA. **Med. Sci. Monit.**, v. 18, n. 6, BR199–BR207, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.12659/msm.882895>.

JANKOWSKA, K. Premature ovarian failure. **Prz Menopauzalny**, v. 16, n. 2, p. 51-56, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.5114/pm.2017.68592>.

JONASSON, G.; RYTHÉN, M. Alveolar bone loss in osteoporosis: a loaded and cellular affair? **Clin. Cosmet. Investig. Dent.**, v. 8, p. 95–103, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/CCIDE.S92774>.

KANG, J. H. *et al.* 5-Lipoxygenase inhibitors suppress RANKL-induced osteoclast formation via NFATc1 expression. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 23, n. 23, p. 7069–7078, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.09.025>.

KANG, J. H.; LIM, H.; LEE, D. S.; YIM, M. Montelukast inhibits RANKL induced osteoclast formation and bone loss via CysLTR1 and P2Y12. **Molecular Medicine Reports**, v. 18, n. 2, p. 2387–2398, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9179>

KAPPELER, C. J.; HOYER, P. B. 4-vinylcyclohexene diepoxide: a model chemical for ovotoxicity. **Syst. Biol. Reprod. Med.**, v. 58, n. 1, p. 57–62, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/19396368.2011.648820>.

KHOSLA, S.; MONROE, D. G. Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, v. 8, n. 1, p. a031211, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a031211>.

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

KIM, K. *et al.* NFATc1 Induces Osteoclast Fusion Via Up-Regulation of Atp6v0d2 and the Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein (DC-STAMP). **Molecular Endocrinology**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 176-185, 1 jan. 2008. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/me.2007-0237>.

KINALSKI, M. A. *et al.* Dental implant therapy in the Brazilian Public System: an overview of the last decade. **Braz. J. Oral Sci.**, v. 19, p. e200126, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.20396/bjos.v19i0.8660126>.

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

LEE, J. M. *et al.* 5-Lipoxygenase mediates RANKL-induced osteoclast formation via the cysteinyl leukotriene receptor 1. **J. Immunol.**, v. 189, n. 11, p. 5284–5292, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1003738>.



LEVAOT, Noam. *et al.* Osteoclast fusion is initiated by a small subset of RANKL-stimulated monocyte progenitors, which can fuse to RANKL-unstimulated progenitors. **Bone**, [S.L.], v. 79, p. 21-28, out. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.021>.

LISOWSKA, B.; KOSSON, D.; DOMARACKA, K. Lights and shadows of NSAIDs in bone healing: the role of prostaglandins in bone metabolism. **Drug Des. Devel. Ther.**, v. 12, p. 1753–1758, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S164562>.

LIU, W. *et al.* Conditions and possible mechanisms of VCD-induced ovarian failure. **Altern. Lab. Anim.**, v. 43, n. 6, p. 385–392, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/026119291504300606>.

LIU, Y. *et al.* WNT3A accelerates delayed alveolar bone repair in ovariectomized mice. **Osteoporos. Int.**, v. 30, n. 9, p. 1873–1885, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-019-05071-x>.

MAHMOUD, R. H. *et al.* Alveolar socket healing in 5-lipoxygenase knockout aged female mice treated or not with high dose of zoledronic acid. **Sci. Rep.**, v. 11, n. 1, p. 19535, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-98713-2>.

MANIGRASSO, M. B.; O'CONNOR, J. P. Accelerated fracture healing in mice lacking the 5-lipoxygenase gene. **Acta Orthop.**, v. 81, n. 6, p. 748–755, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/17453674.2010.533931>.

MARK-KAPPELER, C. J. *et al.* Inhibition of ovarian KIT phosphorylation by VCD. **Biol. Reprod.**, v. 85, n. 4, p. 755–762, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.111.092742>.

MILOVANOVIC, P. *et al.* Multi-level characterization of human femoral cortices. **Biomaterials**, v. 45, p. 46–55, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.12.024>.

MOMESSO, N. R. *et al.* Comparative effects of ovariectomy and chemically induced menopause on alveolar bone healing in zoledronate-treated female mice. **Bone**, v. 201, p. 117655, 2025. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2025.117655>.

OMI, M.; MISHINA, Y. Roles of osteoclasts in alveolar bone remodeling. **Genesis**, v. 60, n. 8–9, e23490, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/dvg.23490>.

PARTRIDGE, L.; DEELEN, J.; SLAGBOOM, P. E. Facing up to the global challenges of ageing. **Nature**, v. 561, n. 7721, p. 45–56, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0457-8>.

PETERS-GOLDEN, M.; HENDERSON JÚNIOR, W. R. Leukotrienes. **N. Engl. J. Med.**, v. 357, n. 18, p. 1841-1854, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra071371>.

RADSPIELER, H. *et al.* Is the amount of trabecular bone-loss dependent on bone mineral Density? A study performed by three centres of osteoporosis using high resolution peripheral quantitative computed tomography. **Eur. J. Med. Res.**, v. 5, n. 1, p. 32–39, 2000.

RIBEIRO, K. H. C. *et al.* Dose-response effect of Montelukast on post-extraction dental socket repair and skeletal phenotype of mice. **Odontology**, v. 111, n. 4, p. 891–903, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10266-023-00800-5>.

RUCCI, Nadia; TETI, Anna. The “love–hate” relationship between osteoclasts and bone matrix. *Matrix Biology*, [S.L.], v. 52-54, p. 176-190, maio 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2016.02.009>.

SANTORO, N. *et al.* Characterization of reproductive hormonal dynamics in the perimenopause. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 81, n. 4, p. 1495–1501, 1996. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/jcem.81.4.8636357>.

SCHAFFLER, M. B. *et al.* Osteocytes: master orchestrators of bone. **Calcif. Tissue Int.**, v. 94, n. 1, p. 5–24, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00223-013-9790-y>.

SHIM, J.; IWAYA, C.; AMBROSE, C. G. *et al.* Evaluation of bone structure by microcomputed tomography in aged mice. *Scientific Reports*, v. 12, e8117, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11965-4>

SIDDIQUI, J. A.; PARTRIDGE, N. C. Physiological bone remodeling. **Physiology**, v. 31, n. 3, p. 233–245, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/physiol.00061.2014>.

SIMON, A. M.; O'CONNOR, J. P. Dose and time-dependent effects of cyclooxygenase-2 inhibition on fracture-healing. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 89, n. 3, p. 500–511, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.2106/JBJS.F.00127>.

SØE, Kent. *et al.* Coordination of Fusion and Trafficking of Pre-osteoclasts at the Marrow–Bone Interface. **Calcified Tissue International**, [S.L.], v. 105, n. 4, p. 430–445, 25 jun. 2019. LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00223-019-00575-4>.

SONG, L. *et al.* Optimization of the time window of interest in ovariectomized imprinting control region mice for antiosteoporosis research. **Biomed. Res. Int.**, v. 2017, p. 8417814, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2017/8417814>.

SOPHOCLEOUS, A.; IDRIS, A. I. Ovariectomy/orchiectomy in rodents. **Methods Mol. Biol.**, v. 1914, p. 261–267, 2019. DOI: [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-8997-3\\_13](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-8997-3_13).

SOWERS, M. R. *et al.* Changes in bone resorption across the menopause transition. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 98, n. 7, p. 2854–2863, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2012-4113>.

SYED, F.; KHOSLA, S. Mechanisms of sex steroid effects on bone. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 328, n. 3, p. 688–696, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.01.077>.

TIMMERMANS, S.; VAN MONTAGU, M.; LIBERT, C. Protein-inactivating sequence variations in mouse strains. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 114, n. 34, p. 9158–9163, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.170Biblioteca6168114>.

TU, X. *et al.* Osteocytes mediate the anabolic actions of canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in bone. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 112, n. 5, p. E478–E486, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1409857112>.

VANDAMME, T. F. Use of rodents as models of human diseases. **J. Pharm. Bioallied. Sci.**, v. 6, n. 1, p. 2–9, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/0975-7406.124301>.

WEIN, M. N. Bone lining cells: normal physiology and role in response to anabolic osteoporosis treatments. **Curr. Mol. Biol. Rep.**, v. 3, n. 2, p. 79–84, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s40610-017-0062-x>.

WRIGHT, L. E. *et al.* Skeletal effects of ovariectomy versus chemically induced ovarian failure. **J. Bone Miner. Res.**, v. 23, n. 8, p. 1296–1303, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.080309>.

YAGI, Mitsuru. *et al.* DC-STAMP is essential for cell–cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. **The Journal Of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 202, n. 3, p. 345-351, 1 ago. 2005. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20050645>.

ZHAO, Q. *et al.* NFATc1: functions in osteoclasts. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [S.L.], v. 42, n. 5, p. 576-579, maio 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2009.12.018>.

ZHENG, C.; SHI, X. Cysteinyl leukotriene receptor 1 (cysLT1R) regulates osteoclast differentiation and bone resorption. **Artif. Cells. Nanomed. Biotechnol.**, v. 46, sup. 3, p. S64-S70, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/21691401.2018.1489264>.

## ANEXOS

### ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética no uso Animal (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 "**Análise dos osteoclastos em diferentes modelos de estropausa induzida sob influência do montelucaste de sódio no reparo ósseo intramembranoso e endocondral de camundongos C57BL/6**", Processo FOA nº 461-2024, 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 29 de Julho de 2024.

**VALIDADE DESTES CERTIFICADO:** 01 de Março de 2026.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 01 de Abril de 2026.

#### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Analysis of the osteoclasts in different models of induced estropause under the influence of sodium montelukast in intramembranous and endochondral bone repair of C57Bl/6 mice**", Protocol FOA nº 461-2024, 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 July 29, 2024.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** March 01, 2026.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** April 01, 2026.

**Prof. Dr. Fellippo Ramos Verri**  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator