

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 28/07/2025.



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

**NATAIRA REGINA MOMESSO**

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

**Araçatuba - SP  
2023**

**NATAIRA REGINA MOMESSO**

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

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

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

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Cristina Bigueti

Coorientador: Prof. Assoc. Edilson Ervolino

**Araçatuba - SP  
2023**

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

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

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

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

Black D7  
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

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

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ao Departamento de Fisiologia pela disponibilização do biotério e laboratórios.

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

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

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

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

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

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

*Acredite em si mesmo e tudo será possível.*

*Elvis Presley*

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

## RESUMO

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

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

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

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

## **ABSTRACT**

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

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

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

## LISTA DE FIGURAS

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

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

## LISTA DE TABELAS

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

## LISTA DE SIGLAS

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

## SUMÁRIO

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

## **6 CONCLUSÃO**

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

## REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

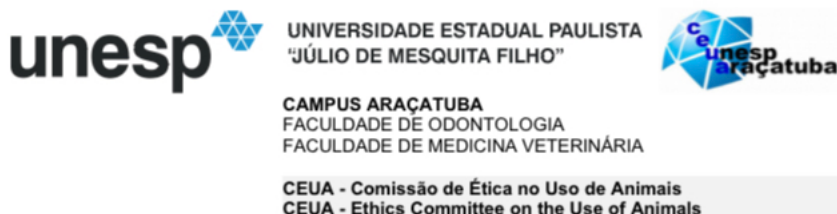
VIEIRA, A. E. *et al.* Intramembranous bone healing process subsequent to tooth extraction in mice: micro-computed tomography, histomorphometric and molecular characterization. **Plos One**, v. 10, n. 5, p. e0128021, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0128021>.

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

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

## ANEXOS

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



#### CERTIFICADO

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

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 07 de Abril de 2022.

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

#### CERTIFICATE

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

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** April 07, 2022.

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

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

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