



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

ANA CAROLINA ZUCON BACELAR

**Análise comparativa do reparo alveolar em camundongos
fêmeas C57BL/6 em falência ovariana provocada pela
senescência, induzida quimicamente ou por ovariectomia**

Araçatuba - SP
2022

ANA CAROLINA ZUCON BACELAR

**Análise comparativa do reparo alveolar em camundongos
fêmeas C57BL/6 em falência ovariana provocada pela
senescência, induzida quimicamente ou por ovariectomia**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Orientadora: Prof^a. Assoc. Dr^a. Mariza Akemi Matsumoto

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

Prof. Assist. Dr. Antonio Hernandez Chaves Neto

**Araçatuba - SP
2022**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Bacelar, Ana Carolina Zucon.

B117a Análise comparativa do reparo alveolar em camundongos fêmeas C57BL/6 em falência ovariana provocada pela senescência, induzida quimicamente ou por ovariectomia /

Ana Carolina Zucon Bacelar. - Araçatuba, 2022
49 f. : il.; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Mariza Akemi Matsumoto
Coorientadora: Profa. Claudia Cristina Bigueti
Coorientador: Prof. Antonio Hernandes Chaves Neto

1. Camundongos 2. Envelhecimento 3. Menopausa
4. Osteoporose 5. Regeneração óssea I.T.

Black D72
CDD 617.64

Ana Claudia M. Grieger Manzatti CRB-8/6315

Aos meus pais, Sônia Maria Zucon Bacelar e José Fernando Bacelar, com amor e gratidão dedico este trabalho e todos os méritos alcançados até aqui. Agradeço todas as oportunidades que sempre me deram para alcançar meus sonhos, toda compreensão nos dias difíceis e toda dedicação e esforço diários.

Ao meu irmão, Fernando Zucon Bacelar, meu grande amigo e companheiro que sempre me inspira e ensina.

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora por me sustentarem e fortalecerem todos os dias da minha vida.

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

À minha orientadora, Prof^a Mariza Akemi Matsumoto, que me acolheu desde o meu primeiro ano de graduação. Agradeço por todas as oportunidades que me foram concedidas ao longo desses anos, por todo conhecimento transmitido e por nossa relação ultrapassar as barreiras da ciência e se tornar uma amizade. Obrigada por contribuir com a minha formação e por ser meu grande exemplo de professora.

À minha coorientadora, Prof^a Claudia Cristina Biguetti, por todo exemplo de competência e comprometimento. Admiro seu olhar detalhado que é capaz de refinar qualquer trabalho e seu capricho em tudo o que faz. Obrigada por sempre me ajudar e inspirar.

Ao meu coorientador, Prof Antonio Hernandes Chaves Neto, que me acolheu e me ajudou a entender o imenso mundo da bioquímica. Educação, comprometimento e gentileza são virtudes visíveis em você. Obrigada pela imensa contribuição e por todos os ensinamentos.

Ao meu namorado, Paulo Henrique Marcolino, agradeço por sempre me ouvir e entender, por apoiar meus sonhos e me encorajar em todos os momentos. Seu cuidado e amor são impulso para minha caminhada. Obrigada por estar aqui, eu te amo!

Aos amigos do grupo de pesquisa, pós-graduandos e alunos de iniciação científica, Nataira Momesso, André Oliva, Raquel Parra, Kim Henderson, Vinicius Rosa, Danilo Masocatto, Ramez Mahamoud, Gustavo Simionatto, Samyra Tazaki, Felipe Pederro, Ana Carolyna Becher, Ana Julia Moreno e Juliana Meira, pela amizade construída e pelo trabalho em equipe desde o cuidado com os animais até o desenvolvimento dos projetos de pesquisa. Sozinhos não chegamos a lugar nenhum, vocês foram essenciais para o alcance de todas essas etapas.

Ao Prof Edilson Ervolino, pela imensa colaboração nos experimentos e por toda contribuição no desenvolvimento deste trabalho. Um grande exemplo de professor e pesquisador pelo qual tenho grande admiração.

À Prof^a Roberta Okamoto, por estar sempre presente e disponível. Sua alegria e delicadeza constantes, unidas a sua dedicação e competência me motivam nos caminhos da docência.

À Prof^a Alaíde Gonçalves, pelo apoio, colaboração, compartilhamento dos seus conhecimentos e convivência enriquecedora.

Ao Departamento de Ciências Básicas, através do Prof Cláudio Casatti, Prof^a Doris Sumida, Prof José Américo, Prof Paulo Roberto Botacin e dos servidores técnico-administrativos Eliseide Maria Ferreira Silva Navega, André Luís Mattos

Piedade, Sandra Aparecida dos Santos Pinheiro, Arnaldo César dos Santos pela convivência e viabilidade de execução dos experimentos laboratoriais.

Ao Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, através do Prof Francisley Ávila Souza, Prof Leonardo Perez Faverani, Prof^a Ana Paula Bassi, Prof Idelmo Rangel Garcia Júnior, Prof^a Alessandra Aranega, Prof^a Daniela Ponzoni e Prof Osvaldo Magro Filho por todo ensinamento e apoio transmitidos ao longo do meu mestrado nas disciplinas, clínicas e plantões.

Ao Dr André Fabris por todos os ensinamentos transmitidos nos plantões.

Ao Departamento de Fisiologia pela disponibilização do biotério e laboratórios.

Ao Prof Jesus Carlos Andreo pela disponibilidade e colaboração.

Aos colegas da pós-graduação em CTBMF, Mateus Pavelski, Eduardo Dallazen, Barbara Rios, Jonathas Piassi pelos momentos e conhecimentos compartilhamos nos plantões e clínicas e, em especial, minha grande amiga e eterna dupla Naara Monteiro que me deu forças ao longo de toda minha trajetória na graduação e mestrado.

À Agência de Fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela concessão de 13 meses de bolsa.

À Agência de Fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa através do Processo nº 2020/07999-7.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Santa Teresa de Calcutá

BACELAR, A. C. Z. **Análise comparativa do reparo alveolar em camundongos fêmeas C57BL/6 em falência ovariana provocada pela senescência, induzida quimicamente ou por ovariectomia.** 2022. 49 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

Diferentes modelos animais são utilizados para investigação do metabolismo e reparo ósseo pós-menopausa, resultando em diferentes impactos na produção dos hormônios ovarianos. O presente trabalho analisou e comparou o processo de reparo ósseo intramembranoso após a extração dentária de camundongos fêmeas em condição de estropausa fisiológica, induzida quimicamente e por ovariectomia, bem como os níveis séricos de marcadores ósseos e de estresse oxidativo. Foram utilizados 46 camundongos fêmeas C57BL/6J, com idades iniciais entre 4, 6 e 18 meses, pesando cerca de 25 - 28 gramas, as quais constituíram cinco grupos: CT – animais que não receberam nenhum tratamento (6 meses), SHAM – ovariectomia fictícia (4 meses), OVX – submetidas a ovariectomia (4 meses), VCD – medicadas com diepóxido 4-vinilciclohexeno (VCD) (4 meses) na dose de 160 mg/Kg/dia, via IP por 20 dias consecutivos e ID – em período pós-estropausa fisiológica (18 meses). Constatada a condição de diestro persistente nos animais de todos os grupos, os mesmos foram submetidos a exodontia do incisivo superior direito para posterior eutanásia nos períodos de 7 e 21 dias, quando as maxilas contendo os alvéolos foram removidas para obtenção de lâminas histológicas coradas com HE, Tricrômico de Goldner e para a técnica imuno-histoquímica para as proteínas RANKL e OPG. O sangue também foi coletado para as análises bioquímicas para dosagem dos níveis de cálcio, fosfato, fosfatase alcalina (FAL) e TRAP total, bem como para capacidade antioxidante total e TBARs. A análise histopatológica revelou que todos os alvéolos repararam aos 21 dias; porém, com diferenças nos aspectos histomorfológicos entre os grupos. Os grupos Controle e SHAM apresentaram trabeculado ósseo regular e em remodelação com moderada marcação para RANKL e OPG. Já os grupos OVX e Idosa apresentaram trabéculas ósseas irregulares e delgadas desde o dia 7, as quais mostravam-se pouco celularizadas aos 21 dias. O grupo VCD exibiu neoformação mais discreta aos 7 dias, porém, com tecido ósseo em franca remodelação aos 21 dias. Apesar destas diferenças, notou-se moderada marcação para RANKL e OPG nestes grupos, com destaque para o infiltrado inflamatório mononuclear. Os níveis

séricos de TRAP e FAL estavam significativamente aumentados no grupo Idosa aos 21 dias em comparação com os demais grupos, bem como a capacidade antioxidante total. Não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis de cálcio e fosfato, e em TBARs. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que os diferentes modelos de falência ovariana, fisiológica ou precoce, interferem de modo distinto no reparo ósseo alveolar pós-exodontia, bem como nos níveis séricos nos marcadores de remodelação óssea e de capacidade antioxidante, devendo ser considerados no momento da seleção do modelo e correlação com os achados clínicos em humanos.

Palavras-chave: Camundongos. Envelhecimento. Menopausa. Osteoporose. Regeneração óssea.

BACELAR, A. C. Z. **Comparative analysis of alveolar repair in female C57BL/6 mice in ovarian failure caused by senescence, chemically induced or by ovariectomy.** 2022. 49 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

Different animal models are used to investigate postmenopausal metabolism and bone repair, resulting in different impacts on ovarian hormone production. The present work analyzed and compared the intramembranous bone repair process after tooth extraction in female mice in physiological stropause, chemically induced and by ovariectomy, as well as the serum levels of bone markers and oxidative stress. Forty-six C57BL/6J female mice were used, with initial ages between 4, 6 and 18 months, weighing about 25 - 28 grams, which constituted five groups: CT - animals that did not receive any treatment (6 months), SHAM - ovariectomy dummy (4 months), OVX – submitted to ovariectomy (4 months), VCD – medicated with 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) (4 months) at a dose of 160 mg/kg/day, via IP for 20 consecutive days and ID – in the physiological post-estropause period (18 months). Once the condition of persistent diestrus was observed in the animals of all groups, they were submitted to extraction of the upper right incisor for later euthanasia in the periods of 7 and 21 days, when the jaws containing the alveoli were removed to obtain histological slides stained with HE, Goldner trichrome and for the immunohistochemical technique for RANKL and OPG proteins. Blood was also collected for biochemical analysis to measure calcium, phosphate, alkaline phosphatase (FAL) and total TRAP levels, as well as for total antioxidant capacity and TBARs. Histopathological analysis revealed that all alveoli repaired at 21 days; however, with differences in histomorphological aspects between the groups. The Control and SHAM groups showed regular bone trabeculation and remodeling with moderate staining for RANKL and OPG. On the other hand, the OVX and Elderly groups presented irregular and thin bone trabeculae from day 7, which showed little cellularization at day 21. The VCD group exhibited more discrete neoformation at 7 days, however, with bone tissue in clear remodeling at 21 days. Despite these differences, moderate staining for RANKL and OPG was observed in these groups, with emphasis on the mononuclear inflammatory infiltrate. The serum levels of TRAP and FAL were significantly increased in the Elderly group at 21 days compared to the other groups, as well as the total antioxidant capacity. No statistical

differences were observed in calcium and phosphate levels, and in TBARs. From the results obtained, it can be concluded that the different models of ovarian failure, physiological or early, interfere differently in post-extraction alveolar bone repair, as well as in the serum levels of bone remodeling and antioxidant capacity markers, and should be considered at the time of model selection and correlation with clinical findings in humans.

Keywords: Mice. Aging. Menopause. Osteoporosis. Bone regeneration.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Linha do tempo referente aos procedimentos a serem realizados nos grupos CT, SHAM, OVX, VCD e ID 27
- FIGURA 2 - Aspecto histopatológico dos alvéolos em reparação, aos 7 e 21 dias, dos grupos CT, SHAM, OVX, VCD e ID (HE e TG+Alcian blue, aumento original 40x) 33
- FIGURA 3 - Aspecto histopatológico dos alvéolos em reparação, aos 7 e 21 dias, dos grupos CT, SHAM, OVX, VCD e ID (HE, aumento original 100x) 33
- FIGURA 4 - A) Aspecto das trabéculas ósseas aos 7 dias do grupo VCD. B) Notam-se trabéculas irregulares e pouco celularizadas no grupo OVX aos 21 dias (HE; aumento original 100x) 34
- FIGURA 5 - Observa-se imunomarcção para OPG nas células osteoblásticas (setas), aos 7 e 21 dias. Nota-se imunomarcção para RANKL nas células osteoblásticas (setas pretas), osteócitos (setas azuis) e leucócitos (setas finas) (aumento original 100x) 37
- FIGURA 6 - Resultados estatísticos referentes às análises bioquímicas. Os asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos e períodos. A normalidade dos resultados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk. A análise estatística foi realizada utilizando-se os testes ANOVA seguido de Tukey, considerando $p < 0,05$ 39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Distribuição dos animais pertencentes aos grupos CT, SHAM, OVX, VCD e ID 23

TABELA 2 – Aspectos histopatológicos dos alvéolos pós-exodontia dos grupos CT, SHAM, OVX, VCD e ID aos 7 e 21 dias 35

TABELA 3 – Médias e desvio-padrão obtidos a partir das análises bioquímicas. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos considerando o mesmo período experimental ($p \leq 0,05$). Normalidade dos resultados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. A análise estatística foi realizada pela análise da variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey 40

LISTA DE SIGLAS

AFC	Contagem de Folículos Antrais
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CT	Controle
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FAL	Fosfatase Alcalina
FRAP	Poder de Redução do Ferro
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
HE	Hematoxilina e Eosina
HPG	Hipotalâmico-hipófise-gonadal
ICS	Incisivo Superior Direito
ID	Idosas
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
LH	Hormônio Luteinizante
MDA	Malonaldeído
OVX	Ovariectomizadas
PBS	Solução de Tampão Fosfato
pNP	p-Nitrofenol
pNPP	p-Nitrofenilfosfato
PVPI	Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante
SHAM	Ovariectomia Fictícia
TBARs	Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico
TG	Tricrômico de Goldner
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina
TRACP total	Capacidade Antioxidante Total
VCD	Diepóxido de 4-Vinilciclohexeno

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	14
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivos Gerais	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Aspectos Éticos	23
3.2 Modelo Experimental	23
3.3 Delineamento Experimental	23
3.4 Tratamento Farmacológico com VCD	24
3.5 Procedimento Cirúrgico para Ovariectomia	24
3.6 Cirurgia de Ovariectomia Fictícia	25
3.7 Avaliação da Citologia Vaginal Diária	25
3.8 Procedimento Cirúrgico para Exodontia	26
3.9 Eutanásias e Coleta de Amostras de Plasma	28
3.10 Análises Bioquímicas	28
3.10.1 Concentrações Plasmáticas de Cálcio e Fosfato Inorgânico	28
3.10.2 Atividades de TRAP e Fosfatase Alcalina	28
3.10.3 Capacidade Antioxidante Total do Plasma	29
3.10.4 Peroxidação Lipídica Plasmática	29
3.11 Coleta dos Espécimes	30
3.12 Procedimentos Histotécnicos	30
3.13 Análise Morfológica Microscópica	30
3.14 Técnica Imuno-histoquímica	30
3.15 Análises Estatísticas	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Análise Histopatológica	32
4.2 Análise Imuno-histoquímica	36
4.3 Análise Bioquímica	38
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A menopausa humana é caracterizada pela redução dos hormônios ovarianos, estrógeno e progesterona, decorrente do esgotamento dos folículos ovarianos, acompanhado do aumento das concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH), representando a fase final do processo de envelhecimento do sistema reprodutor feminino (LI; WANG, 2018). Não se trata de um evento abrupto, mas sim uma transição que perdura de 4 a 6 anos (KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016), ocorrendo fisiologicamente em mulheres de faixa etária entre 49 a 58 anos, embora possa ser induzida, seja por procedimento cirúrgico, por quimioterapia ou radiação. Com o aumento na expectativa de vida, estima-se que as mulheres viverão cerca de 40% de suas vidas no período pós-menopausa. Diversas manifestações clínicas são descritas a respeito da menopausa tais como osteoporose, episódios vasomotores, problemas urogenitais, alterações de humor, distúrbios do sono, cardiovasculares, dentre outros, que influenciam a qualidade de vida das mulheres (GRACIA; FREEMAN, 2018; JONES; BOELAERT, 2015; TAKAHASHI; JOHNSON, 2015). Dentre tais manifestações clínicas, os efeitos deletérios da osteoporose sobre a capacidade de reparo do tecido ósseo são de particular interesse na clínica odontológica, uma vez que tratamentos mais invasivos (exodontias, enxertos ósseos e implantes dentários) são mais comuns em pacientes adultos em faixa etária mais avançada.

Apesar de questionável, a suplementação hormonal ou terapia de reposição hormonal com estrógeno pode ser usada para o tratamento destas manifestações clínicas, incluindo os efeitos sobre o metabolismo do tecido ósseo (NELSON, 2008; TAKAHASHI; JOHNSON, 2015). Diversos estudos confirmam o papel do estrógeno sobre o tecido ósseo, principalmente frente a correlação existente entre seus baixos índices e a osteoporose, uma vez que esse hormônio atua a nível tecidual e celular. Os níveis ideais de estrógeno são responsáveis por manter a substância óssea, promover o equilíbrio entre a osteogênese e reabsorção óssea, e afetar a formação, ciclo biológico e atividade funcional de osteoclastos e osteoblastos (KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016; LI; WANG, 2018). O período de transição da menopausa, ou transmenopausa, é a fase oportuna para intervenções que visem a prevenção da perda óssea rápida e danos microarquiteturais que podem resultar na condição de osteoporose.

Roedores como ratos e camundongos representam modelos adequados para pesquisas envolvendo os efeitos deletérios do envelhecimento e senescência sobre o tecido ósseo, pois suas trajetórias de envelhecimento e sistema reprodutivo já são bem definidos. Neste sentido, camundongos apresentam diversas vantagens, pois são animais de metabolismo rápido e de vida curta (aproximadamente 24 meses), e requerem quantidades mínimas de drogas devido ao seu tamanho. Além disso, o modelo de reparo ósseo alveolar relembra de forma precisa o processo ocorrido em humanos, porém em períodos mais curtos: formação de coágulo sanguíneo e inflamação que perduram por volta dos 7 dias, seguida de deposição de tecido de granulação ricamente vascularizados; alvéolo em processo de remodelação aos 14 dias, e trabéculas ósseas maduras por volta de 21 dias (VIEIRA *et al.*, 2015). De acordo com estudos para avaliar o processo de reparo ósseo aplicados à diferentes situações clínicas, como no desenvolvimento de osteonecrose medicamentosa no processo de reparo alveolar pós exodontia (BIGUETTI *et al.*, 2019), e no reparo do tecido musculoesquelético frente à injúrias (BIGUETTI *et al.*, 2020), observa-se que em animais senescentes, há um evidente atraso na reabsorção do coágulo sanguíneo, resolução do processo inflamatório e deposição de matriz óssea comparado ao que se observa em animais adultos jovens.

De fato, os camundongos apresentam similaridade aos seres humanos em alguns aspectos do envelhecimento, o que torna possível correlacionar as duas espécies dentro de certos limites, já que a taxa de amadurecimento de camundongos C57BL/6J ocorre 150 vezes mais rápido no primeiro mês de vida e 45 vezes mais rápido nos cinco meses seguintes quando comparados aos humanos. Dos 3 aos 6 meses são considerados adultos, o que equivale à faixa etária de humanos de 20-30 anos e após os 6 meses, a taxa de maturidade passa a ser 25 vezes mais rápida que nos seres humanos (HAGAN, 2017). Num período de 4 a 5 dias, os camundongos fêmeas completam o ciclo estral que contempla quatro fases, sendo elas proestro, estro, metestro e diestro (CORA.; KOOISTRA; TRAVLOS, 2015; KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016), sendo que o diestro é o estágio mais longo do ciclo estral de camundongos e ratos com duração média de 48 a 72 horas (CORA; KOOISTRA; TRAVLOS, 2015).

Levando em consideração a epidemiologia clínica da pós-menopausa em mulheres, camundongos fêmeas idosas podem representar um modelo adequado

para avaliar o impacto da insuficiência ovariana na perda óssea (WRIGHT *et al.*, 2008), bem como no reparo de injúrias (BIGUETTI *et al.*, 2019). Entretanto, Koebele e Bimonte-Nelson (2016) apontam a desvantagem de que nos camundongos idosos geralmente não há depleção dos folículos ovarianos no início do envelhecimento, como ocorre para as mulheres. Então, os níveis de hormônio gonadais se diferem, pois para as mulheres no período pós-menopausa observam-se baixos níveis de 17 β -estradiol e progesterona e níveis elevados de FSH e hormônio luteinizante (LH). Já os roedores experimentam vários estados de envelhecimento reprodutivo e normalmente mantem a circulação moderada de 17 β -estradiol, apesar da desregulação do eixo hipotalâmico-hipófise-gonadal (HPG). Os animais envelhecidos passam a apresentar ciclos estrais irregulares a partir de 9 a 12 meses, experimentando de alterações hormonais, mas permanecem em estropausa e não em menopausa verdadeira, se compararmos com os humanos (LIU *et al.*, 2015).

Baseado na relevância dos efeitos e consequências do período de peri e pós-menopausa na vida das mulheres, faz-se importante o uso de modelos animais que representem as variáveis fortemente acometidas por esse fator. Deste modo, torna-se possível elucidar as características destas fases no processo de envelhecimento e compará-las aos modelos induzidos química ou cirurgicamente. Um fator importante a ser observado é a linhagem do modelo animal utilizado, quando se compara os resultados obtidos entre linhagens diferentes pode-se chegar a conclusões que não são fidedignas, visto que existem variações biológicas que devem ser consideradas (CORA; KOOISTRA; TRAVLOS, 2015; HUBSCHER; BROOKS; JOHNSON, 2005).

O modelo animal mais utilizado de osteoporose pós-estropausa é obtido por meio do procedimento cirúrgico denominado ovariectomia, sendo que nos camundongos a perda de osso esponjoso ocorre logo após este procedimento. Em ratos é observada perda óssea significativa na metáfise tibial proximal após 14 dias, no corpo vertebral lombar após 60 dias e no colo do fêmur após 30 dias. Além disso, ocorre redução da espessura cortical e aumento na cavidade de medula óssea entre 90 a 120 dias após o procedimento cirúrgico (KOMORI, 2015). A ovariectomia retrata de forma precisa a menopausa cirúrgica em mulheres; entretanto, a menopausa fisiológica ocorre na maioria das mulheres, tendo que se considerar que mesmo no período pós-menopausa ainda há liberação de andrógenos e baixos níveis de esteróides. Este fato aponta uma desvantagem na utilização da técnica da

ovariectomia, na qual os ovários são removidos antes que estas alterações possam ocorrer (BROOKS; POLLON; HOYER, 2016). Portanto, deve-se considerar que neste modelo, não há o período de peri-estropausa (LIU *et al.*, 2015), e consequentemente, o modelo de ovariectomia resulta em um perfil hormonal consideravelmente diferente, bem como um eixo HPG alterado, em comparação com os animais com trato reprodutivo preservado (KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016).

No entanto, há a possibilidade de utilização de um método químico, com o uso da droga diepóxido químico de 4-vinilciclohexeno (VCD), que reproduz a transição da menopausa humana fisiológica de forma mais semelhante, uma vez que há a permanência do tecido ovariano em combinação com a depleção folicular. Este medicamento foi inicialmente indicado para o controle populacional de ratos na tentativa de se reduzir o emprego de raticidas, uma vez que causa falência ovariana prematura e ser de fácil administração, podendo ser utilizado por via oral (DYER *et al.*, 2013). Nos anos 2.000, seu uso foi introduzido na pesquisa com modelos animais de menopausa transitória, bloqueando a autofosforilação do proto-oncogene c-kit de óocitos de folículos primordiais e primários, portanto, sem atingir folículos em crescimento (BROOKS; POLLON; HOYER, 2016; DYER *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2015). Ainda, o VCD altera a expressão e distribuição da família de proteínas Bcl-2 que regulam a apoptose dos folículos ovarianos, dentre elas Bcl-xL, Bax e Bak, induz a liberação do citocromo C no citosol celular, desencadeando a atividade de sinalização em cascata da caspase, fenômenos que estão relacionados à atresia folicular acelerada (LIU *et al.*, 2015; MAYER *et al.*, 2004).

Os perfis hormonais e séricos de gonadotrofinas após o uso do VCD em modelos animais demonstraram ser semelhantes aos de mulheres menopausadas e com ovário intacto. Na pesquisa clínica, a contagem dos folículos antrais (AFC) é frequentemente usada como um biomarcador para a capacidade de reprodução no contexto da fertilidade e na transição para menopausa, sendo que a AFC pode ser um marcador mais preciso do que os níveis séricos de gonadotrofina e hormônio gonadal, já que eles flutuam erratically na transição da menopausa humana (KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016). Com o modelo VCD é possível avaliar como a contagem de folículos ovarianos se relaciona com o envelhecimento reprodutivo em roedores e também permite compreender a respeito do impacto do tecido ovariano intacto pós-menopausa e a liberação contínua de andrógenos e a relação a outros hormônios

esteroides circulantes provenientes de fontes extra-ovarianas (KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016; LIU *et al.*, 2015).

Pesquisas já tem demonstrado que a senescência reprodutiva induzida por VCD está associada à resistência à insulina, perda óssea, desenvolvimento de lesão aterosclerótica e mudanças de comportamento semelhantes à ansiedade, os quais são riscos negativos à saúde relacionados ao envelhecimento e à transição da menopausa em mulheres (KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016). Estudos demonstraram que ratos Sprague Dawley adultos (154 dias) parecem ser mais sensíveis aos efeitos do VCD do que ratos peri-adolescentes (28 dias) por estarem mais perto da depleção folicular natural, por isso podem ser os mais adequados para o estudo da peri-estropausa. Com o uso do VCD, a perda folicular é mais grave nos camundongos do que nos ratos, consequentemente, os camundongos são mais suscetíveis a sua ação de ovotoxicidade. No entanto, faz-se importante ressaltar que o VCD não induz efeitos tóxicos significativos em outros tecidos (LIU *et al.*, 2015). Ao longo das exposições ao VCD os folículos primordiais não podem ser ativados, resultando em atresia e, consequentemente, insuficiência ovariana. Wright *et al.* (2008) constataram a insuficiência ovariana em média 6 semanas após o início da administração IP do VCD (160mg/kg/d) durante 15 dias utilizando camundongos C57BL/6Hsd, enfatizando que os animais ovariectomizados apresentaram significativa deterioração da microarquitetura óssea trabecular quando comparados com o modelo de estropausa quimicamente induzida por VCD, bem como redução da área e espessura do osso cortical na diáfise do fêmur quando comparados ao grupo controle e VCD.

Num estudo de Liu *et al.* (2015) com camundongos fêmeas B6C3F1 de 28 dias medicadas diariamente com VCD (160mg/kg/dia) durante 20 dias, ocorreu a perda de todos os folículos ovarianos, sendo que o período médio de insuficiência ovariana foi de 52 dias, com aumento dos níveis de FSH após 35 dias e, consequentemente, redução do peso dos ovários e útero. Portanto, o modelo VCD pode ser útil para avaliar alterações dinâmicas do envelhecimento ovariano feminino após a perda folicular. Diante disso, fica evidente que tais modelos experimentais, cirúrgico e químico, levam ao envelhecimento precoce do sistema reprodutor feminino de maneiras distintas entre si, e quando comparados com o envelhecimento natural, resultando em alterações sistêmicas igualmente diferentes que podem interferir nos

processos de reparação tecidual, especialmente o ósseo. Devido à crescente possibilidade de reabilitações orais com próteses implante-suportadas, a necessidade de se manter uma quantidade e qualidade óssea na região dos maxilares se faz cada vez mais importante. No entanto, é interessante ressaltar que os estudos clínicos sobre os efeitos da osteoporose pós-menopausa na região dos maxilares não relatam como as mulheres chegaram à esta fase, mas considerando-se a faixa etária da população analisada, supõe-se que a grande maioria tenha atingido a pós-menopausa naturalmente, como demonstrado por Hohlweg-Majert *et al.* (2006) a partir de uma extensa revisão de literatura sobre o assunto. Neste estudo, os autores destacam a pequena quantidade de trabalhos que incluem pacientes jovens e, como resultados, confirmam os efeitos da osteoporose nos maxilares, especialmente na maxila, porém, em menor severidade que nos ossos longos como o fêmur.

Estudos pré-clínicos em roedores que associam a osteoporose induzida cirurgicamente (ovariectomia) ao processo de reparo ósseo alveolar, objetivo do presente estudo, são encontrados na literatura, com preferência utilizando o modelo de ratos fêmeas. Apesar de se considerar óbvia a influência negativa da depleção hormonal nestes animais durante este processo, há estudos que justificam seu desenvolvimento com base no questionamento se, de fato, esta condição, bem como a osteopenia, seriam fatores de risco para o atraso no reparo alveolar (ARIOKA *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2018a). No entanto, quando se trata do tema “reparo alveolar”, parece haver uma confusão em termos conceituais, uma vez que considera-se o reparo peri-implantar (CHEN *et al.*, 2018b) e de enxertos ósseos autógenos (LUIZE *et al.*, 2008), em região dos maxilares como sendo “reparos alveolares”, conforme observado no estudo de Arioka *et al.* (2019), possivelmente por se tratar de áreas de rebordo ou processo alveolar. Sabe-se, porém, que claramente estas são condições totalmente distintas. Além disso, há dificuldade em se comparar diferentes modelos animais, abordados em diferentes idades e por diferentes métodos, o que pode levar a conclusões inverídicas pelo leitor. Diante disto, Yousefzadeh *et al.* (2020), estabeleceram um guia com fatores importantes a se considerar quando da utilização do modelo de ratas osteoporóticas por meio de ovariectomia, como: 1) escolha da linhagem, 2) idade ideal; 3) técnica cirúrgica e 4) método de avaliação da condição estral dos animais. A partir de uma revisão metódica e comparativa dos estudos, chegaram à conclusão que as ratas Sprague-Dawley e Wistar aos 6 meses de idade

são as mais adequadas para o procedimento de ovariectomia. Infelizmente, não foram encontrados estudos desta natureza com camundongos o que torna mais explícita a variedade destes fatores, ainda mais quando se tenta comparar diferentes modelos.

Liu *et al.* (2019) ao compararem o processo de reparo alveolar entre camundongos fêmeas BALB-C jovens (cerca de 2,5 meses de idade – 6 semanas) ovariectomizadas (OVX) e idosas (>12 meses), observaram que além das alterações no esqueleto apendicular, a região de processo alveolar também apresentava características osteoporóticas semelhantes, retardando o processo de reparo alveolar na região de molares. Do mesmo modo, Chen *et al.* (2018a) observaram atraso no reparo alveolar de ratas jovens ovariectomizadas (4,5 meses de idade). No entanto, nesta investigação, as alterações no trabeculado ósseo alveolar mostraram-se discretamente alteradas nestes animais quando comparadas às ratas idosas, sugerindo, de modo cauteloso, uma certa “resistência” desta região às alterações hormonais.

Estudos a respeito da estropausa induzida quimicamente com o VCD sobre o esqueleto de roedores, bem como sobre seus marcadores endócrinos são encontrados na literatura (CAO *et al.*, 2020; KALAM; TALEGAONKAR; VOHORA, 2016). No entanto, infelizmente, não foi possível encontrar trabalhos que tenham utilizado o VCD para avaliação específica do reparo alveolar em modelos de ratos e camundongos na base de dados PubMed utilizando-se os termos MeSH: “4-vinylcyclohexene diepoxide”, “VCD”, “mice”, “rat”, “alveolar repair”, “alveolar bone repair”, “socket repair”, “socket bone repair”. Considerando-se os efeitos do VCD e da ovariectomia no tecido ósseo já mencionados acima, bem como a ausência de estudos que avaliem os efeitos do VCD e o comparem com a estropausa induzida cirurgicamente e o envelhecimento natural sobre o reparo ósseo alveolar em um único modelo animal - camundongos fêmeas C57BL/6 - o qual é consagradamente o mais conhecido e utilizado nas ciências biológicas e da saúde, pretende-se investigar seus efeitos no processo de reparo alveolar fornecendo dados sobre este modelo animal e, deste modo, possibilitar futuras estratégias terapêuticas e preventivas na odontologia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O presente estudo tem como objetivo comparar o impacto da condição de estropausa fisiológica, induzida quimicamente, por ovariectomia e simulação de ovariectomia em camundongos fêmeas no processo de reparo ósseo alveolar nos períodos de 7 e 21 dias pós exodontia.

2.2 Objetivos Específicos

Analisar o impacto da depleção hormonal induzida por condição de estropausa fisiológica, induzida quimicamente, e por ovariectomia sobre a cinética histopatológica do reparo alveolar e remodelação óssea em fêmeas de camundongos. Maxilas de fêmeas de camundongos dos diferentes grupos serão coletados após 7 e 21 dias da realização das exodontias e submetidos a análise morfológica de parâmetros relacionados à reparação: vasos, sanguíneos osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e matriz óssea. Para tanto, os cortes histológicos serão corados em hematoxilina e eosina (HE) e Tricrômico de Goldner (TG) + Alcian Blue;

Analisar o impacto da depleção hormonal induzida por condição de estropausa fisiológica, induzida quimicamente, e por ovariectomia sobre a cinética de parâmetros locais de remodelação óssea (OPG E RANKL) durante o reparo alveolar em fêmeas de camundongos. As maxilas dos diferentes grupos serão coletadas após 7 e 21 dias da realização das exodontias e submetidos a análise qualitativa para marcação das proteínas OPG E RANKL, por meio de técnica imuno-histoquímica;

Determinar a influência da depleção hormonal induzida por condição de estropausa fisiológica, induzida quimicamente, e por ovariectomia sobre níveis plasmáticos de cálcio, fosfato, atividade da fosfatase alcalina (FAL) e capacidade antioxidante total (TRACP total), atividade da TRAP e de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em fêmeas de camundongos submetidos à exodontia. O plasma obtido na eutanásia dos animais será submetido à ensaios bioquímicos e as concentrações de cálcio e fósforo, dos marcadores de remodelação óssea, FAL e

TRAP, e marcadores de estresse oxidativo, TRACP total e TBARS, serão determinadas por métodos colorimétricos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

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

3.2 Modelo experimental

Foram utilizados 46 camundongos fêmeas C57BL/6, com idades de 4, 6 e 18 meses e peso variando entre 25 e 38 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto e mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA-UNESP. Os animais foram colocados em gaiolas de polipropileno, com até cinco animais em cada gaiola, forradas com maravalha branca de pinho autoclavada trocada duas vezes por semana. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram no biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA-UNESP, sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz de 12 horas claro/escuro e exaustão, recebendo água e ração sem restrição. Serão seguidas as recomendações do guia ARRIVE (KILKENNY *et al.*, 2010).

3.3 Delineamento experimental

Os animais serão distribuídos em 5 grupos, conforme descrito a seguir:

TABELA 1 – Distribuição dos animais pertencentes aos grupos CT, SHAM, OVX, VCD e ID

Grupos/ Tratamentos	Controle (CT)	Ovariectomia fictícia (SHAM)	Ovariectomiza das (OVX)	Tratadas com VCD (VCD)	Idosas (ID)
7 dias pós-exodontia	6 meses (n=3)	4 meses (n=5)	4 meses (n=5)	4 meses (n=5)	18 meses (n=5)
21 dias pós-exodontia	6 meses (n=3)	4 meses (n=5)	4 meses (n=5)	4 meses (n=5)	18 meses (n=5)

Fonte: Autor, 2022

Ao atingirem 18 meses, o ciclo estral das fêmeas idosas (ID) (n=10) foi avaliado por meio da citologia vaginal diária. Foi realizada a coloração com azul de toluidina e análise microscópica para constatação da permanência do diestro. As fêmeas jovens compuseram quatro grupos, sendo que no primeiro, o grupo controle (CT) as mesmas não foram submetidas à nenhum tratamento (n=6), no segundo grupo foram submetidas a ovariectomia fictícia (SHAM) (n=10), no terceiro grupo as fêmeas foram OVX (n=10) e o quarto grupo (n=10) recebeu o VCD 160mg/kg/d via intraperitoneal (IP) durante 20 dias para induzir a ineficiência ovariana, e, após 52 dias do início da administração do VCD foi realizado o monitoramento do ciclo estral por citologia vaginal (LIU *et al.*, 2015). Ao ser constatado o diestro permanente foi realizada a exodontia do incisivo central superior e, posteriormente, a eutanásia dos animais nos períodos de 7 e 21 dias para coleta da maxila contendo os alvéolos cujo dente foi extraído.

3.4 Tratamento farmacológico com VCD

Os camundongos fêmeas na idade de 4 meses do grupo VCD foram tratadas com injeções IP 160mg/Kg de VCD (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., Cotia, São Paulo, Brasil) durante 20 dias, seguindo protocolo previamente estabelecido (KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016; LIU *et al.*, 2015; WRIGHT *et al.*, 2008). Quando na avaliação diária da citologia vaginal houve persistência de diestro por 10 dias, concluiu-se que a insuficiência ovariana foi atingida (BROOKS; POLLOW; HOYER, 2016; LOHFF *et al.*, 2006).

3.5 Procedimento cirúrgico para ovariectomia

Com 4 meses, os animais do grupo OVX foram pesados em balança digital, imediatamente antes de qualquer procedimento cirúrgico, para qualificação correta da dosagem de anestésico. Os animais foram submetidos à sedação por meio de injeção IM do anestésico Ketamina a 1% com dose de 50 mg/kg (Francotar®, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil) associado ao sedativo Cloridrato de Xilazina a 2% com dose de 5 mg/kg (Virbaxyl 2%®, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil). Em seguida, foi realizada tricotomia unilateral à coluna lombar, e antisepsia da região a ser incisada com

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

3.6 Cirurgia de ovariectomia fictícia

Ao atingirem 4 meses, os animais do grupo SHAM foram submetidos à cirurgia fictícia de ovariectomia que é constituída pela mesma sequência do procedimento cirúrgico para ovariectomia, com exceção da remoção do ovário que será localizado e tracionado juntamente com a almofada de gordura ovariana e, posteriormente, os órgãos serão recolocados na cavidade abdominal.

3.7 Avaliação da citologia vaginal diária

Com auxílio de uma ponteira coleta-se 50µl de solução salina. O camundongo foi segurado pela cauda, garantindo que as patas traseiras estivessem suspensas. A ponteira foi colocada delicadamente na abertura do canal vaginal, aproximadamente

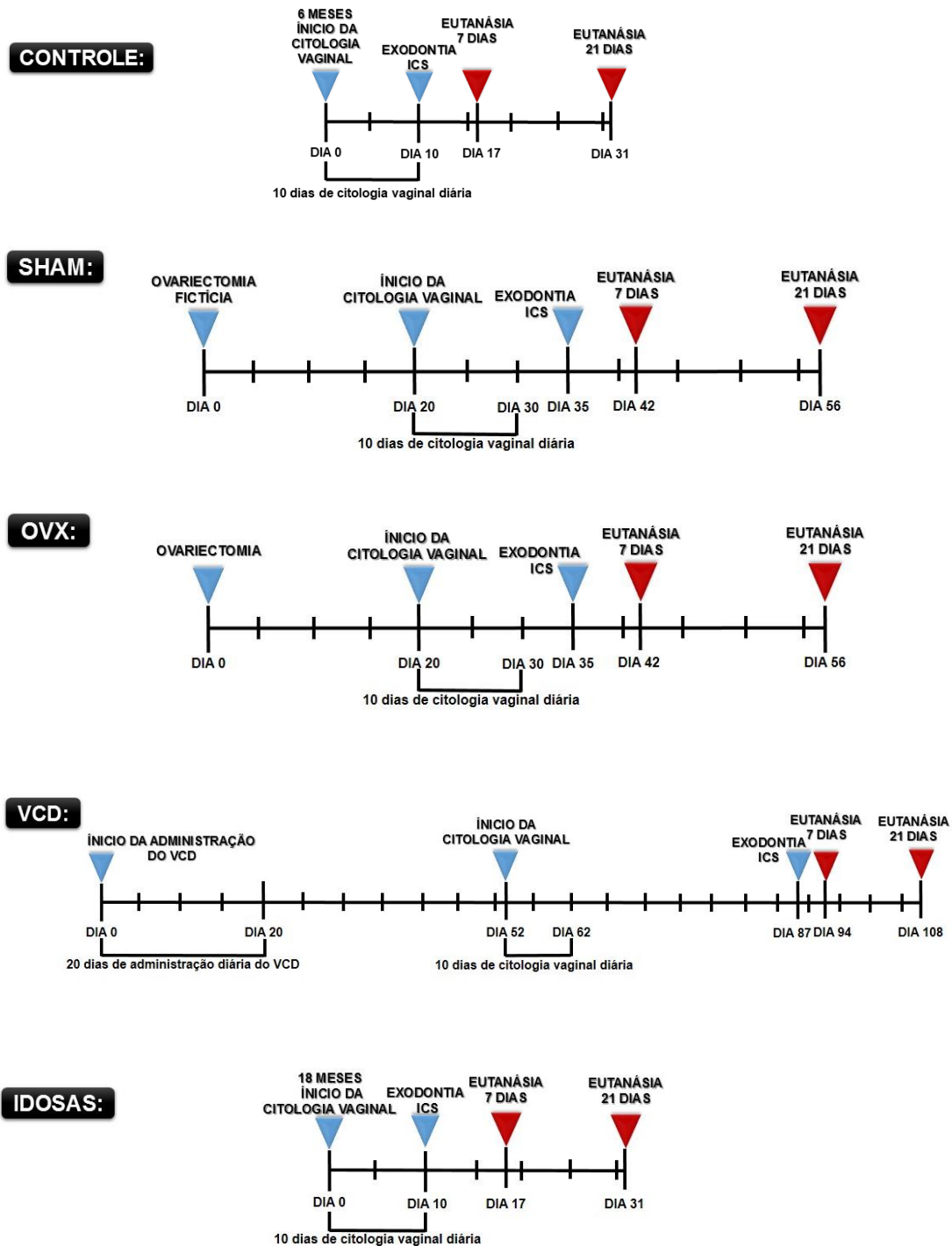
1-2mm em camundongos (CORA; KOOISTRA; TRAVLOS, 2015). Os 50µl foram expelidos e o líquido foi espontaneamente aspirado para dentro do canal. Após isso, liberou-se lentamente a pressão exercida sobre a pipeta para que o fluído retornasse à ponteira. É necessário expelir e aspirar o líquido de 2-3 vezes para garantir um número de células suficientes na amostra. O líquido foi colocado sobre a lâmina de vidro. Após secar em temperatura ambiente, recebeu o corante azul de toluidina durante 1 minuto. Posteriormente, foi feita lavagem em água destilada por 1 minuto. Através da microscopia de luz foram determinados os tipos e proporções de células presentes que permitem identificar em qual fase do ciclo estral o animal se encontra. Considerar-se-á a fase diestro quando houve predomínio de neutrófilos, algumas células epiteliais nucleadas e raras células epiteliais escamosas cornificadas (CORA; KOOISTRA; TRAVLOS, 2015; MCLEAN *et al.*, 2012).

3.8 Procedimento cirúrgico para exodontia

Os animais foram submetidos à sedação por meio de injeção IP do anestésico Ketamina a 1% com dose de 50 mg/kg (Francotar®, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil) associado ao sedativo Cloridrato de Xilazina a 2% com dose de 5 mg/kg (Virbaxyl 2%®, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil). Constatada a sedação profunda dos animais, foi realizada uma incisão sulcular ao redor do dente incisivo superior (ICS) direito com micro lâmina de bisturi (Fine Science Tools®). Em ato contínuo, foi realizada divulsão da mucosa inserida com auxílio de uma sonda exploradora adaptada, conforme previamente descrito, a mesma utilizada para luxação e extração propriamente dita (BIGUETTI *et al.*, 2019). Posteriormente, o alvéolo foi irrigado com soro fisiológico 0,9% estéril.

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

FIGURA 1 - Linha do tempo referente aos procedimentos a serem realizados nos grupos CT, SHAM, OVX, VCD e ID



Fonte: Autor, 2022

3.9 Eutanásias e coleta de amostras de plasma

Após os períodos de 7 e 21 dias pós-exodontia, os animais foram sedados e eutanasiados por meio de decapitação para proceder-se a coleta de cerca de 0,7 ml de sangue de cada animal, imediatamente transferidos para tubos heparinizados a fim de se obter o plasma por centrifugação (1.000 x g, 4o C, por 10 minutos). As amostras de plasma foram armazenadas em freezer a -80° C até o momento da realização dos ensaios bioquímicos.

3.10 Análises Bioquímicas

3.10.1 Concentrações plasmáticas de cálcio e fosfato inorgânico

As concentrações de cálcio e fósforo foram determinadas por métodos colorimétricos de ponto final baseado na sua reação com a púrpura de ftaleína em meio alcalino, formando um complexo de cor violeta que é medido em 570nm. A concentração de fósforo inorgânico foi determinada por método de fotometria em ultravioleta de ponto final baseado na sua reação com o fósforo inorgânico da amostra que reage com o heptamolibdato de amônia em meio fortemente ácido, formando um complexo de fosfomolibdato cuja absorbância em 340 nm é proporcional à concentração de fósforo na amostra (CONNERTY; BRIGGS, 1966; DALY; ERTINGSHAUSEN, 1972). As concentrações de cálcio e fósforo plasmáticas foram expressas em mg/dL. O teor de cálcio foi determinado pelo método Arsenazo III, enquanto o fosfato inorgânico plasmático foi analisado pelo método do molibdato de amônio, ambos utilizando um kit comercial adquirido da Bioclin (Belo Horizonte, MG, Brasil).

3.10.2 Atividades de TRAP e Fosfatase Alcalina

A atividade de TRAP foi medida por hidrólises de p-Nitrofenilfosfato (pNPP) a p-Nitrofenol (pNP) em pH 5,8, na presença de tartarato de sódio e benzoato de p-hidroximercurio (BRASILINO *et al.*, 2018), este último atua inibindo as fosfatases ácidas de baixo peso molecular (LAIDLER; TAGA; VAN ET TEN, 1982). A atividade da FAL foi medida com base na capacidade dessas enzimas de catalisar a hidrólise de

pNPP a pNP em pH 9,4, na presença de cloreto de magnésio (CHAVES NETO *et al.*, 2011). Em ambas as determinações, a formação de pNP foi determinada espectrofotometricamente por meio da leitura da absorbância em 405 nm, utilizando um coeficiente de extinção molar de $18.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Controles sem enzima foram incluídos em cada ensaio para ajustar a hidrólise não enzimática de pNPP. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar $1 \mu\text{mol}$ de pNPP por minuto a 37°C . As atividades TRAP e FAL foram expressas como U/L.

3.10.3 Capacidade antioxidante total do plasma

A capacidade antioxidante total do plasma foi determinada usando o ensaio FRAP (poder de redução do ferro), conforme descrito anteriormente por Benzie e Strain (1996), baseado na redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} , que é quelado por 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) para formar o complexo Fe^{2+} -TPTZ com absorbância máxima em 593 nm. Os resultados foram calculados usando uma curva padrão construída usando diferentes concentrações de soluções de FeSO_4 . Os resultados foram expressos em mmol/L Fe^{2+} .

3.10.4 Peroxidação lipídica plasmática

Os produtos da peroxidação lipídica foram determinados com base nos níveis de TBARs, o que resultou na produção de malonaldeído (MDA), como principal produto dessa reação. TBARs plasmático foi medido como descrito anteriormente (BUEGE; AUST, 1978). Resumidamente, alíquotas foram misturadas com 15% (p/v) de ácido tricloroacético mais 0,375% (p/v) de ácido tiobarbitúrico e aquecidas a 100°C por 15 min. As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente, centrifugadas a $1000\times g$ por 15 min, e sua absorbância foi medida em 532 nm. A quantidade de TBARs é calculada usando o coeficiente de extinção molar $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$.

3.11 Coleta dos espécimes

Após a coleta do sangue, foram removidas as maxilas com os alvéolos após-exodontia, e imediatamente imersas em formalina a 10% tamponada por período de 48 horas. Após este período, foram lavados em água corrente por 12 horas antes de serem acondicionados em álcool 70°, seguiram para o processo de desmineralização em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 10% tamponado com pH 7,0.

3.12 Procedimentos histotécnicos

As maxilas foram lavadas em água corrente e acondicionados em solução EDTA a 10% tamponado com pH 7,0, com trocas realizadas duas vezes por semana por 30 dias aproximadamente, até que não apresentassem resistência ao corte com navalha. As amostras foram novamente lavadas em água corrente, e foram desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina (Histosec® Merck, Darmstadt, Alemanha). Os blocos de parafina foram submetidos a cortes histológicos semi-seriados no sentido transversal ao longo eixo do alvéolo, utilizando-se micrótomo Leica RM. Foram obtidos cortes semi-seriados de 5 µm de espessura para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Goldner + Alcian Blue e cortes de 3 µm de espessura para técnica imuno-histoquímica.

3.13 Análise morfológica microscópica

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

3.14 Técnica imuno-histoquímica

Para a determinação dos padrões moleculares das regiões de reparo e remodelação óssea foram padronizados os anticorpos para a caracterização da

capacidade osteogênica e osteoclastogênica, bem como a qualidade do tecido ósseo por meio de marcação imunohistoquímica do balanço da remodelação óssea pela marcação de RANKL e OPG. Para tanto, cortes de 3 μ m foram tratados com proteinase K por 30 minutos em temperatura ambiente. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 2% por 1 hora e lavados em PBS (Phosphate buffer solution). Após este período, foram utilizados os anticorpos primários policlonais anti-RANKL e anti-OPG, em ambiente refrigerado por 24 horas, e lavados com PBS por 5 minutos, por três vezes. Após isto, os cortes incubados com anticorpos primários anti-rabbit foram incubados com o polímero-HRP (Easy Link One, EasyPath, Immunobioscience Corp., EUA) por 30 minutos, e em seguida, corados com o DAB (diaminobenzidina) (DAKO, Lab.) e contra-corados com Hematoxilina de Harris. Os cortes incubados com anticorpos primários anti-goat foram incubados com polímero Immpress/HRP (Vector Labs, Southfield, EUA). Para controle negativo foi omitido o anticorpo primário.

3.15 Análises Estatísticas

A avaliação dos dados quantitativos ocorreu após a obtenção dos dados bioquímicos, que foram analisados quanto à sua distribuição de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk a fim de se definir os testes apropriados. A análise estatística foi realizada utilizando-se os testes ANOVA seguido de Tukey, todos os testes estatísticos foram avaliados ao nível de significância de 5% ($p < 0.05$) e foram aplicados através dos programas GraphPadInStat e Prism5 (GraphPad, San Diego, CA).

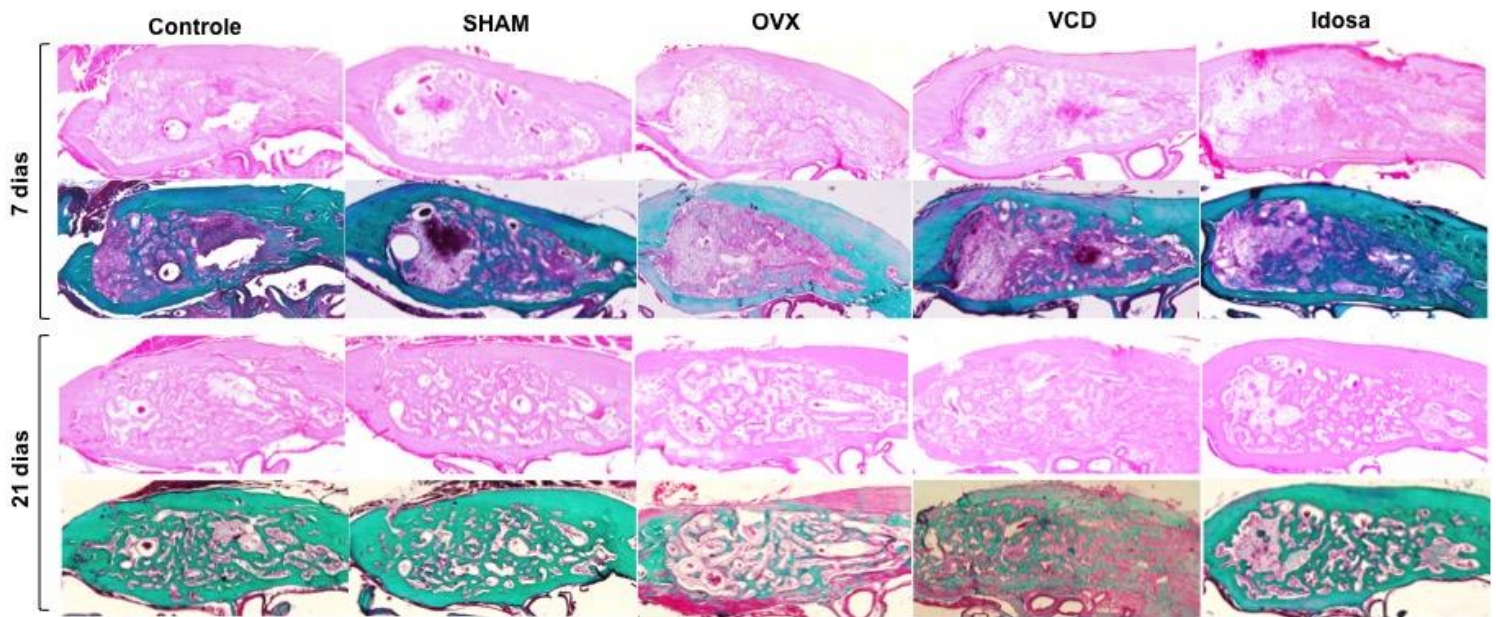
4 RESULTADOS

4.1 Análise histopatológica

Aos 7 dias, os alvéolos dos Grupos CT e SHAM apresentaram aspectos histopatológicos similares, estando preenchidos por trabéculas ósseas primárias irregulares e em intensa atividade osteogênica, em meio a tecido conjuntivo rico em vasos sanguíneos e discretamente infiltrados por leucócitos mononucleares. O Grupo OVX exibiu alvéolos parcialmente preenchidos por delgadas trabéculas ósseas neoformadas exibindo intensa atividade osteogênica em meio a tecido conjuntivo frouxo vascularizado e com discreto infiltrado inflamatório mononuclear. Já no Grupo VCD, foi possível observar a presença de trabéculas ósseas neoformadas localizadas predominantemente na periferia dos alvéolos. Chamou a atenção o aspecto irregular da matriz óssea e aspecto dos osteócitos, grosseiramente aprisionados na matriz, bem como a presença de focos de coágulo no tecido conjuntivo que permeava as trabéculas. Os alvéolos dos camundongos ID também se apresentavam preenchidos por trabéculas ósseas ora irregulares e revestidas por osteoblastos, ora sem contorno definido, em meio a tecido conjuntivo discretamente infiltrado por leucócitos mononucleares.

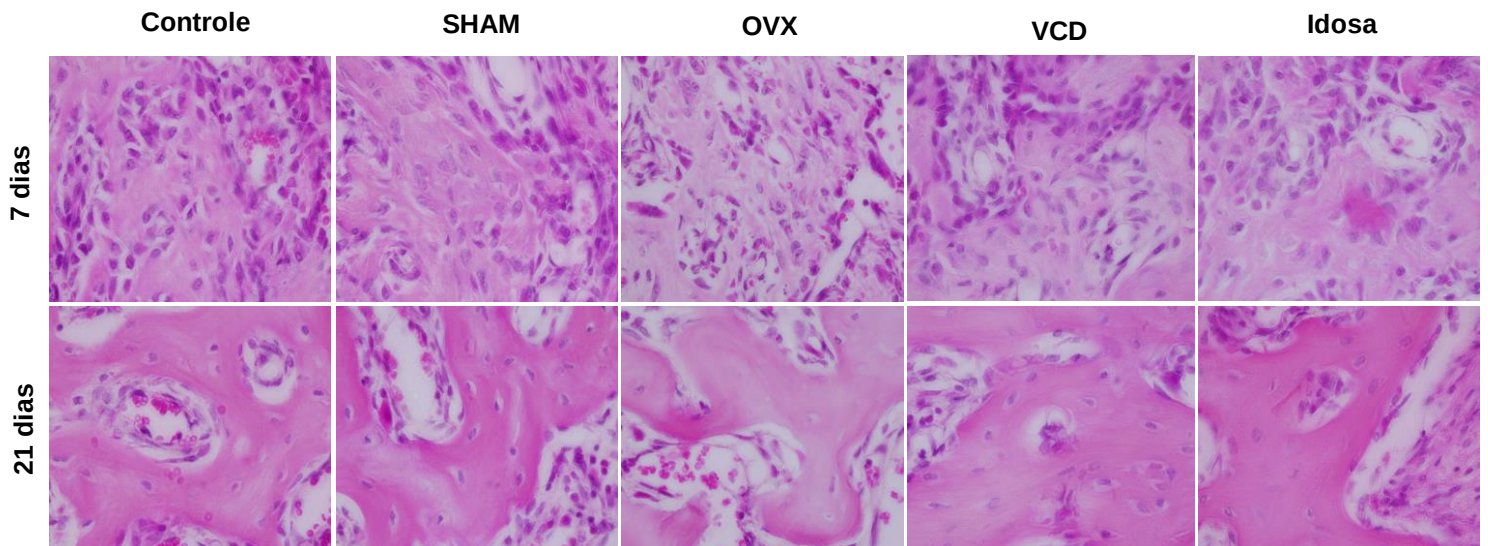
Após 21 dias, os Grupos CT e SHAM exibiam alvéolos preenchidos por trabéculas ósseas maduras em remodelação, em meio a espaços medulares constituídos por tecido conjuntivo frouxo, rico em vasos sanguíneos e discreto infiltrado leucocitário mononuclear. Os alvéolos do grupo OVX, por sua vez, mostravam trabéculas ósseas maduras mais delgadas e espaçadas, pouco celularizadas, permeadas por tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado. De modo interessante, os animais medicados com VCD apresentaram alvéolos preenchidos por trabéculas ósseas regulares e espessas, em processo de reabsorção. No grupo ID observaram-se trabéculas maduras pouco celularizadas em meio a tecido conjuntivo com focos de leucócitos mononucleares (Figura 2).

FIGURA 2 - Aspecto histopatológico dos alvéolos em reparação, aos 7 e 21 dias, dos grupos CT, SHAM, OVX, VCD e ID (HE e TG+Alcian blue, aumento original 40x)



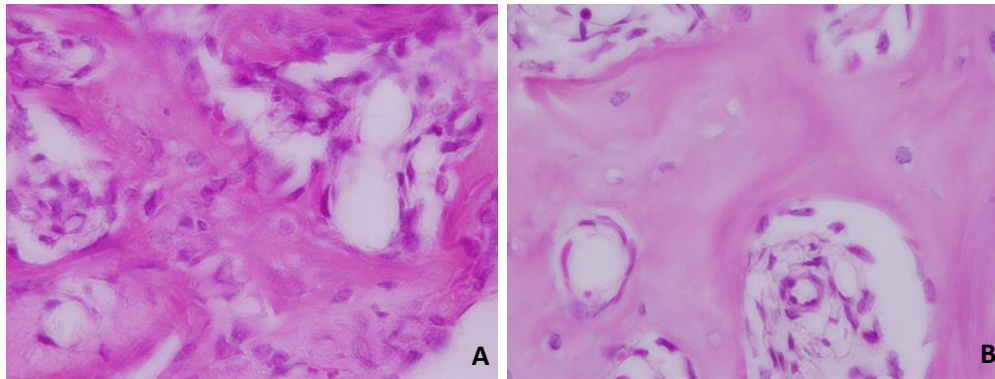
Fonte: Autor, 2022

FIGURA 3 - Aspecto histopatológico dos alvéolos em reparação, aos 7 e 21 dias, dos grupos CT, SHAM, OVX, VCD e ID (HE, aumento original 100x)



Fonte: Autor, 2022

FIGURA 4 - A) Aspecto das trabéculas ósseas aos 7 dias do grupo VCD. B) Notam-se trabéculas irregulares e pouco celularizadas no grupo OVX aos 21 dias (HE; aumento original 100x)



Fonte: Autor, 2022

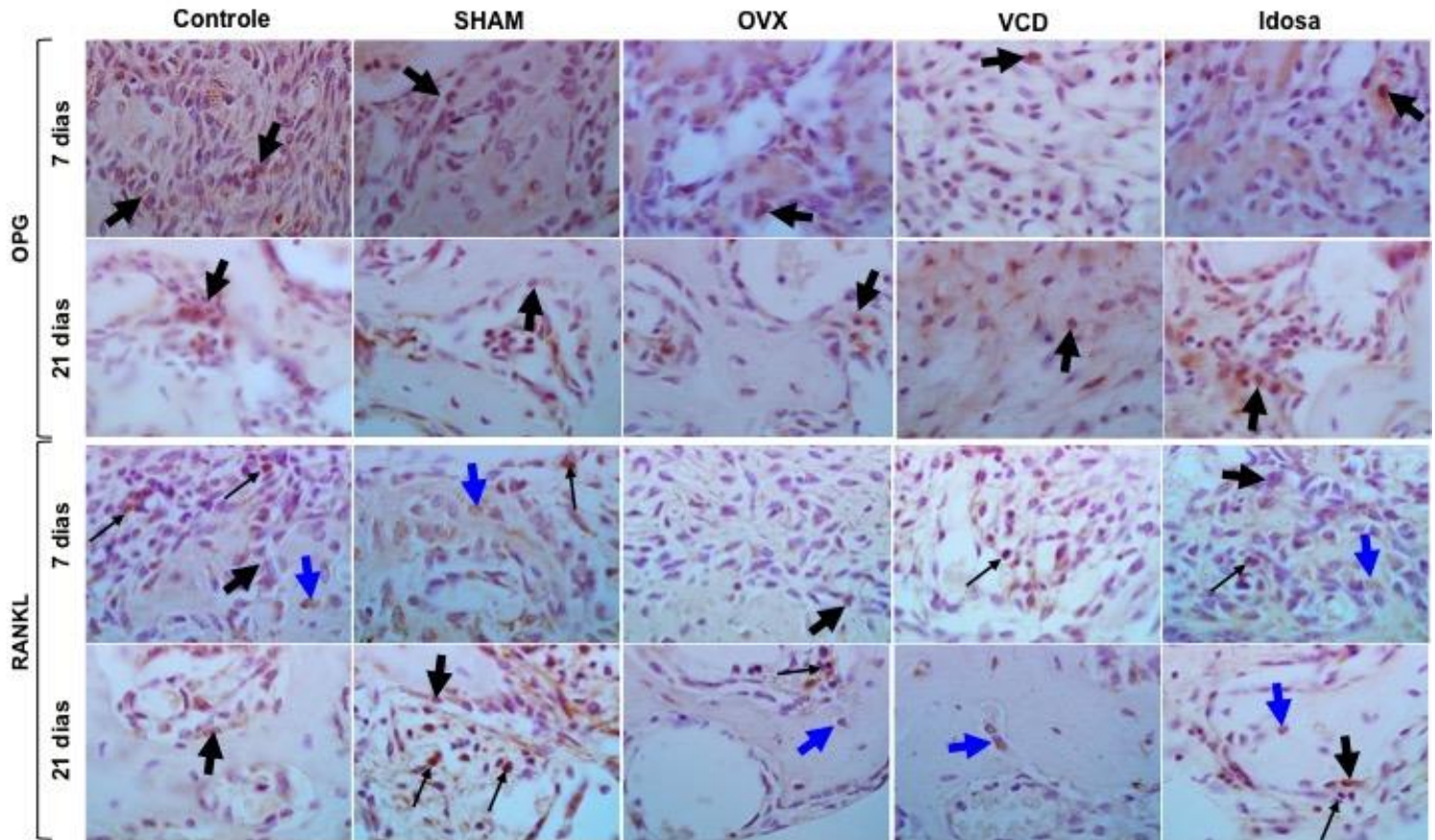
TABELA 2 – Aspectos histopatológicos dos alvéolos pós-exodontia dos grupos CT, SHAM, OVX, VCD e ID aos 7 e 21 dias

Grupos	7 dias	21 dias
Controle	• Trabéculas ósseas primárias irregulares, intensa atividade osteogênica • Tecido conjuntivo com discreto infiltrado inflamatório mononuclear	• Trabéculas ósseas maduras em remodelação • Espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo frouxo com discreto infiltrado inflamatório mononuclear
SHAM	• Trabéculas ósseas primárias irregulares, intensa atividade osteogênica • Tecido conjuntivo com discreto infiltrado inflamatório mononuclear	• Trabéculas ósseas maduras em remodelação • Espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo frouxo com discreto infiltrado inflamatório mononuclear
OVX	• Trabéculas ósseas imaturas e delgadas, com intensa atividade osteogênica • Tecido conjuntivo com discreto infiltrado inflamatório mononuclear	• Trabéculas ósseas maduras e delgadas, espaçadas e pouco celularizadas • Espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo frouxo
VCD	• Trabéculas ósseas neoformadas, predominantes na periferia dos alvéolos • Matriz óssea irregular e osteócitos “desorganizados” • Tecido conjuntivo com discreto infiltrado inflamatório mononuclear	• Trabéculas ósseas regulares e espessas, em remodelação • Tecido conjuntivo frouxo com discreto infiltrado inflamatório mononuclear
Idosa	• Trabéculas ósseas ora irregulares revestidas por osteoblastos, ora sem contorno definido • Tecido conjuntivo com discreto infiltrado inflamatório mononuclear	• Trabéculas ósseas maduras, pouco celularizadas • Tecido conjuntivo com focos de infiltrado inflamatório mononuclear

4.2 Análise Imuno-histoquímica

A marcação positiva para OPG foi observada no citoplasma das células osteoblásticas em todos os grupos e períodos, e para RANKL foi observada no citoplasma das células osteoblásticas, osteócitos e leucócitos. No entanto, a intensidade das marcações mostrou-se distinta entre os grupos e períodos. Aos 7 dias, os grupos CT e SHAM apresentaram moderada marcação para ambos os alvos, bem como os animais do grupo ID. Já o grupo OVX exibiu moderada marcação para OPG e discreta para RANKL neste período. O oposto foi observado no grupo VCD, onde notou-se discreta marcação para OPG e moderada para RANKL, especialmente nos leucócitos. No período de 21 dias, os grupos CT, SHAM e ID apresentaram equilíbrio entre os marcadores OPG e RANKL, especialmente nas regiões de remodelação. No entanto, nos grupos SHAM e ID, os leucócitos exibiam intensa marcação para RANKL, à semelhança dos animais do grupo OVX. Os grupos VCD também mostraram equilíbrio entre os marcadores, nas áreas de remodelação óssea (Figura 5).

FIGURA 5 - Observa-se imunomarcção para OPG nas células osteoblásticas (setas), aos 7 e 21 dias. Nota-se imunomarcção para RANKL nas células osteoblásticas (setas pretas), osteócitos (setas azuis) e leucócitos (setas finas) (aumento original 100x)

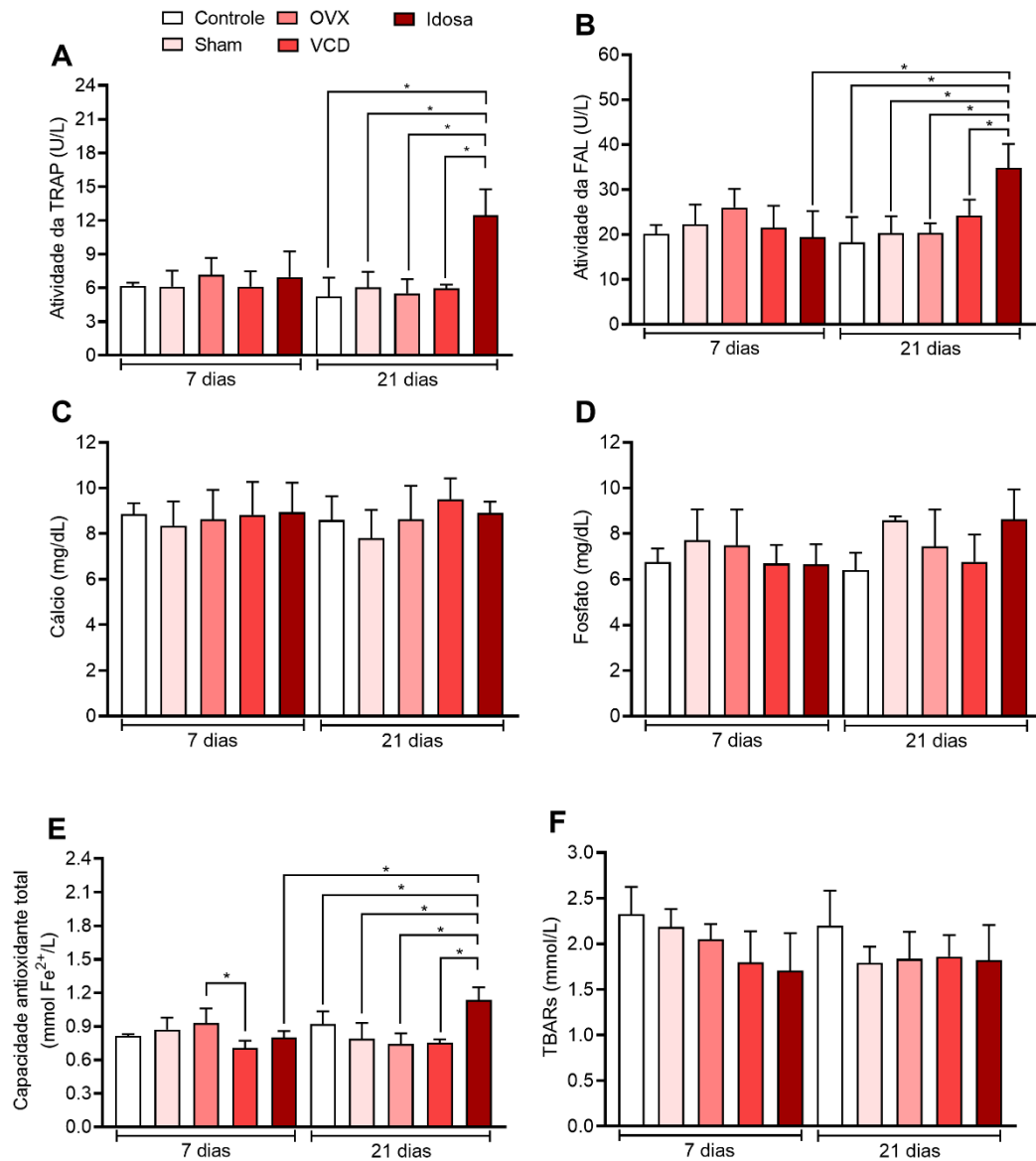


Fonte: Autor, 2022

4.3 Análise Bioquímica

Considerando-se os marcadores relacionados ao metabolismo ósseo, observou-se aumento significativo dos níveis plasmáticos de TRAP no grupo ID (12.48 ± 2.287) em comparação com aos grupos CT (5.267 ± 1.652), SHAM (6.067 ± 1.360), OVX (5.530 ± 1.243) e VCD (5.957 ± 0.3427), aos 21 dias, bem como na FAL, com aumento significativo dos níveis plasmáticos no grupo ID (34.85 ± 5.306) em comparação com com aos grupos CT (18.23 ± 5.662), SHAM (20.34 ± 3.695), OVX (20.44 ± 2.085) e VCD (24.23 ± 3.530), também aos 21 dias. Aos 7 dias não foram detectadas diferenças significativas nos dois marcadores. Os níveis de cálcio e fósforo também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos e períodos. No entanto, analisando-se os marcadores relacionados ao estresse oxidativo, verificou-se que a capacidade antioxidante total estava significativamente aumentada no grupo OVX (0.9312 ± 0.1301) em comparação com VCD (0.7079 ± 0.06380) aos 7 dias. Aos 21 dias, o grupo ID (1.136 ± 0.1136) também apresentou aumento significativo na capacidade antioxidante em comparação com os grupos CT (0.9233 ± 0.1113), SHAM (0.7888 ± 0.1409), OVX (0.7423 ± 0.09445) e VCD (0.7560 ± 0.02907), bem como em comparação com o grupo ID aos 7 dias (0.8006 ± 0.05839). Não foram detectadas diferenças significativamente diferentes entre os grupos e períodos na análise do TBARs (Figura 6, Tabela 3).

FIGURA 6 - Resultados estatísticos referentes às análises bioquímicas. Os asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos e períodos. A normalidade dos resultados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk. A análise estatística foi realizada utilizando-se os testes ANOVA seguido de Tukey, considerando $p < 0,05$



Fonte: Autor, 2022

TABELA 3 – Médias e desvio-padrão obtidos a partir das análises bioquímicas. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos considerando o mesmo período experimental ($p \leq 0,05$). Normalidade dos resultados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. A análise estatística foi realizada pela análise da variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey

	CT 7d	SHAM 7d	OVX 7d	VCD 7d	ID 7d	CT 21d	SHAM 21d	OVX 21d	VCD 21d	ID 21d
TRAP	6.180 ± 0.2848	6.124 ± 1.407	7.180 ± 1.477	6.113 ± 1.373	6.966 ± 2.285	5.267 ± 1.652 a	6.067 ± 1.360 a	5.530 ± 1.243 a	5.957 ± 0.3427 a	12.48 ± 2.287 b
FAL	20.19 ± 1.924	22.27 ± 4.396	26.04 ± 4.091	21.55 ± 4.840	19.48 ± 5.730 a	18.23 ± 5.662 a	20.34 ± 3.695 A	20.44 ± 2.085 a	24.23 ± 3.530 a	34.85 ± 5.306 b
Cálcio	8.863 ± 0.4765	8.346 ± 1.065	8.626 ± 1.295	8.823 ± 1.445	8.930 ± 1.303	8.596 ± 1.041	7.808 ± 1.233	8.631 ± 1.462	9.514 ± 0.9078	8.909 ± 0.4886
Fosfato	6.067 ± 0.5935	7.710 ± 1.362	7.495 ± 1.568	6.692 ± 0.8206	6.660 ± 0.8770	6.406 ± 0.7579	8.588 ± 0.1694	7.445 ± 1.619	6.770 ± 1.199	8.630 ± 1.314
FRAP	0.8132 ± 0.01794	0.8725 ± 0.1060	0.9312 ± 0.1301 c	0.7079 ± 0.06380 D	0.8006 ± 0.05839 a	0.9233 ± 0.1113 a	0.7888 ± 0.1409 a	0.7423 ± 0.09445 a	0.7560 ± 0.02907 a	1.136 ± 0.1136 b
TBARs	2.327 ± 0.2992 a	2.185 ± 0.1950	2.051 ± 0.1662	1.797 ± 0.3402 B	1.708 ± 0.4103 b	2.200 ± 0.3831	1.792 ± 0.1754	1.835 ± 0.2968	1.862 ± 0.2333	1.821 ± 0.3851

Fonte: Autor, 2022

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pelo presente estudo revelaram os efeitos dos diferentes tipos de modelos de pós-estropausa em camundongos C57Bl/6J, considerando o envelhecimento fisiológico nos animais idosos (18 meses) e a falência ovariana prematura quimicamente ou cirurgicamente provocada em animais jovens (4 meses), no curso do reparo intramembranoso de alvéolos dentários após exodontia, bem como nos níveis plasmáticos de marcadores ósseos e de estresse oxidativo. Observou-se que os grupos experimentais OVX, VCD e ID apresentaram diferenças no reparo alveolar em comparação aos grupos CT e SHAM, porém não de maneira idêntica, cabendo ressaltar particularidades de cada modelo.

A falência ovariana causada pelo procedimento de OVX é um dos modelos mais utilizados em roedores a fim de se avaliar a condição óssea pós-menopausa (SÓ *et al.*, 2021), parecendo haver certo consenso de que as consequências que este procedimento causa no metabolismo ósseo interfere de modo significativo no processo de reparo deste tecido. No entanto, Liu *et al.* (2019), levantaram importante questionamento acerca da influência da OVX em modelo de camundongos BALBc no reparo pós exodontia de molar superior, constatando que o reparo ósseo nestas condições ocorre positivamente, porém, de modo mais lento, cerca de o dobro do tempo que nos animais controle – 8 semanas após o procedimento contra 4 semanas nos camundongos controle. Do mesmo modo, estudo anterior realizado em ratas ovariectomizadas (TANAKA *et al.*, 2001) também destacou a reparação dos alvéolos dentários destes animais, do mesmo modo que ocorreu com o grupo controle, não sendo significativamente retardado pelo procedimento de ovariectomia. Em nosso estudo foi possível observar que o reparo alveolar também ocorreu nos animais do grupo OVX já no período de 21 dias. No entanto, os resultados obtidos pelo modelo de OVX depende de várias variáveis como o tipo de animal, dieta associada, períodos experimentais, sítios de extração, entre outros (SÓ *et al.*, 2021). Neste estudo, optou-se por não modificar a dieta fornecida aos animais deste grupo a fim de se analisar a influência do procedimento sem associá-lo a outros fatores.

O tratamento com o VCD influenciou de modo importante a neoformação óssea no interior dos alvéolos em ambos os períodos experimentais, bem como a qualidade do tecido formado. Vale destacar que apesar dos inúmeros trabalhos a respeito dos

efeitos do VCD na depleção ovariana confirmarem ser este o mais próximo à menopausa humana em mulheres com ovários intactos devido ao perfil hormonal que ele provoca (KOEBELE; BIMONTE-NELSON, 2016; LIU *et al.*, 2015), não foram encontrados estudos a respeito de seus efeitos no processo de reparação óssea até a finalização deste trabalho. Em nosso estudo, chamou a atenção as características histomorfológicas das trabéculas ósseas neoformadas, de aspecto irregular acompanhada de distribuição “desorganizada” dos osteócitos, já na primeira semana de reparo (Figura 4 A). Aos 21 dias, ficou evidente a atividade osteoclástica mais intensa neste grupo em comparação com os demais, especialmente com o grupo OVX à semelhança das ID, as quais apresentaram pobre contingente celular (Figura 4 B). Um achado comum nos grupos OVX, VCD e ID, foi a presença de discreto, porém persistente, infiltrado inflamatório mononuclear, positivos para a marcação imuno-histoquímica para RANKL em ambos os períodos. Apesar disto, a imunomarcação para OPG foi constatada em todos os grupos e períodos, indicando que apesar das condições hormonais, a produção de OPG ainda se fazia presente, permitindo a remodelação óssea em maior ou menor intensidade.

As diferenças encontradas entre os modelos OVX e VCD podem traduzir a falta de consenso entre estudos pré-clínicos (ARIOKA *et al.*, 2019; SÓ *et al.*, 2021; TANAKA *et al.*, 2001) e estudos clínicos (SENDYK *et al.*, 2017) a respeito da resposta do processo alveolar aos eventos de exodontia e instalação de implantes dentários.

Pensando nas interferências específicas de cada modelo de falência ovariana prematura, alguns pesquisadores optam pelo uso dos animais pós-menopausadas naturalmente pelo processo de envelhecimento. No entanto, há que se considerar que animais como os camundongos, utilizados no presente estudo, não entram em menopausa verdadeira, mas sim em estropausa, podendo permanecer no ciclo estral mesmo nesta fase da vida (LOHFF *et al.*, 2006), refletindo em perfil hormonal diferente da mulher nesta mesma fase. Esta condição possivelmente justifique os resultados bioquímicos obtidos, onde verificou-se um aumento significativo nos níveis séricos de TRAP e FAL no grupo das ID aos 21 dias em comparação com os demais grupos. Apesar disto, os níveis de cálcio e fósforo não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, corroborando Tanaka *et al.*, (2001), comparando ratas CT e OVX. De modo interessante, detectou-se também aumento significativo da capacidade antioxidante total nos animais idosos neste mesmo período em comparação com os

demais, o que pode sugerir uma atividade compensatória do organismo para combater o aumento do estresse oxidativo próprio do envelhecimento fisiológico, uma vez que não foi encontrada diferença significativa na análise do biomarcador para estresse oxidativo TBARS.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que os diferentes modelos de falência ovariana, fisiológica ou precoce, interferem de modo distinto no reparo ósseo alveolar pós-exodontia, bem como nos níveis séricos nos marcadores de remodelação óssea e de capacidade antioxidante, devendo ser considerados no momento da seleção do modelo que melhor mimetize a situação clínica que se pretende estudar.

REFERÊNCIAS

ARIOKA, M. *et al.* Osteoporotic changes in the periodontium impair alveolar bone healing. **J. Dent. Res.**, v. 98, n. 4, p. 450-458, Jan. 2019. doi: 10.1177/0022034518818456.

BENZIE, IF.; STRAIN, JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal. Biochem.**, v. 239, n. 1, p. 70-76, Jul. 1996. doi: 10.1006/abio.1996.0292.

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, Jun. 2019. doi: 10.1371/journal.pone.0214173.

BIGUETTI, C. C. *et al.* New surgical model for bone-muscle injury reveals age and gender-related healing patterns in the 5 lipoxygenase (5LO) knockout mouse. **Front. Endocrinol.**, v. 11, n. 11, p. 484, Aug. 2020. doi: 10.3389/fendo.2020.00484.

BRASILINO, M. D. S. *et al.* Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves bone formation in the alveolar socket healing after tooth extraction in rats. **Clin. Oral Investig.**, v. 22, n. 3, p. 1449-1461, Apr. 2018. doi: 10.1007/s00784-017-2249-1.

BROOKS, H. L.; POLLON, 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, Jul. 2016. doi: 10.1152/physiol.00057.2014.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Meth. Enzymol.**, v. 52, p. 302-310, 1978. doi: 10.1016/s0076-6879(78)52032-6.

CAO, L. B. *et al.* Systemic changes in a mouse model of VCD-induced premature ovarian failure. **Life Sci.**, v. 262, p.118543, Oct. 2020. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118543.

CHAVES NETO, A. H. *et al.* Antioxidant defense and apoptotic effectors in ascorbic acid and β -glycerophosphate-induced osteoblastic differentiation. **Dev. Growth Differ.**, v. 53, n. 1, p. 88-96, Jan. 2011. doi: 10.1111/j.1440-169X.2010.01232.x.

CHEN, C. H. *et al.* An osteopenic/osteoporotic phenotype delays alveolar bone repair. **Bone**, v. 112, p. 212-219, Jul. 2018a. doi: 10.1016/j.bone.2018.04.019.

CHEN, C. H. *et al.* A comparative assessment of implant site viability in humans and rats. **J Dent Res.**, v. 97, n. 4, p. 451-459, Apr 2018b. doi: 10.1177/0022034517742631.

CONNERTY, H. V.; BRIGGS, A. R. Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, n. 3, p. 290-296, Mar. 1966. doi: 10.1093/ajcp/45.3.290.

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, Aug. 2015. doi: 10.1177/0192623315570339.

DALY, J. A.; ERTINGSHAUSEN, G. Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the "CentrifiChem". **Clin. Chem.**, v. 18, n. 3, p. 263-265, Mar. 1972.

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. **J. Zoo Wildl. Med.**, v. 44, n. 4 Suppl, p. S9-S17, Dec. 2013. doi: 10.1638/1042-7260-44.4S.S9.

GRACIA, C. R.; FREEMAN, E. W. Onset of the menopause transition: the earliest signs and symptoms. **Obstet. Gynecol. Clin. North Am.**, v. 45, n. 4, p. 585-597, Dec. 2018. doi: 10.1016/j.ogc.2018.07.002.

HAGAN, C. **When are mice considered old?** 2017. Disponível em: <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2017/november/when-are-mice-considered-old>. Acesso em: 5 fev. 2020.

HOHLWEG-MAJERT, B. *et al.* Significance of osteoporosis in craniomaxillofacial surgery: A review of the literature. **Osteoporos Int.**, v. 17, n. 2 p. 167–179, Jul. 2006. doi: 10.1007/s00198-005-1967-4.

HUBSCHER, C. H.; BROOKS, D. L.; JOHNSON, J. R. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. **Biotech. Histochem.**, v. 80, n. 2, p. 79-87, 2005. doi: 10.1080/10520290500138422.

JONES, C. M., BOELAERT, K. The endocrinology of ageing: a mini-review. **Gerontology**, v. 61, n. 4, p. 291-300, Nov. 2015. doi: 10.1159/000367692.

KALAM, A.; TALEGAONKAR, S.; VOHORA, D. Differential profile of letrozole and exemestane on bone turnover markers in vinylcyclohexene diepoxide treated ovotoxic female mice. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 30, n. 5, p. 429-439, Oct. 2016. doi: 10.1111/fcp.12208.

KILKENNY, C. *et al.* Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. **PLoS Biol.**, v. 8, n. 6, p. e1000412, Jun. 2010. doi: 10.1371/journal.pbio.1000412

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

KOMORI, T. Animal models for osteoporosis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 759, n. 15, p. 287-294, Jul. 2015. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.028.

LAIDLER, P. M.; TAGA, E. M.; VAN ETTEN, R. L. Human liver acid phosphatases: cysteine residues of the low-molecular-weight enzyme. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 216, n. 2, p. 512-521, Jul. 1982. doi: 10.1016/0003-9861(82)90240-5.

LI, L.; WANG, Z. Ovarian Aging and Osteoporosis. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 1086, p. 199-215, 2018. doi: 10.1007/978-981-13-1117-8_13.

LIU, W. *et al.* Conditions and possible mechanisms of VCD-induced ovarian failure. **Altern. Lab. Anim.**, v. 43, n. 6, p. 385-392, Dec. 2015. doi: 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, Sep. 2019. doi: 10.1007/s00198-019-05071-x.

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: 10.1097/01.gme.0000191883.59799.2e.

LUIZE, D. S. *et al.* Influence of ovariectomy on healing of autogenous bone block grafts in the mandible: a histomorphometric study in an aged rat model. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 23, n. 2, p. 207-214, 2008.

MAYER, L. P. *et al.* The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. **Biol. Reprod.**, v. 71, n. 1, p. 130-138, Jul. 2004. doi: 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. **J. Vis. Exp.**, v. 15, n. 67, p. e4389, Sep. 2012. doi: 10.3791/4389.

NELSON, H. D. Menopause. **Lancet**, v. 371, n. 9614, p. 760-770, Mar. 2008. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60346-3.

SENDYK, D. I. *et al.* Dental implant loss in older versus younger patients: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. **J. Oral Rehabil.**, v. 44, n. 3, p. 229-236, Mar. 2017. doi: 10.1111/joor.12465.

SÓ, B. B. *et al.* Effects of osteoporosis on alveolar bone repair after tooth extraction: A systematic review of preclinical studies. **Arch Oral Biol.**, v. 125, p. 105054, May 2021. doi: 10.1016/j.archoralbio.2021.105054.

SOUZA, V. R. *et al.* Description of ovariectomy protocol in mice. **Methods Mol. Biol.**, v. 1916, p. 303-309, 2019. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2_29.

TAKAHASHI, T. A.; JOHNSON, K. M. Menopause. **Med. Clin. North Am.**, v. 99, n. 3, p. 521-534, May 2015. doi: 10.1016/j.mcna.2015.01.006.

TANAKA, S. *et al.* Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats. **Anat. Rec.**, v. 262, n. 2, p. 203-212, Feb. 2001. doi: 10.1002/1097-0185(20010201)262:2<203::AID-AR1030>3.0.CO;2-#.

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, May 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0128021.

WRIGHT, L. E. *et al.* Comparison of skeletal effects of ovariectomy versus chemically induced ovarian failure in mice. **J. Bone Miner. Res.**, v. 23, n. 8, p. 1296-1303, Aug. 2008. doi: 10.1359/jbmr.080309.

YOUSEFZADEH, N. *et al.* Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide. **EXCLI J.**, v. 19, p. 89-107, Jan. 2020. doi: 10.17179/excli2019-1990.