

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 15/02/2024.



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

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.