



## MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VIVO* EM ODONTOLOGIA

Experimental *in vivo* models in dentistry

José Vitor Mota Lemos<sup>a</sup>, João Eudes Teixeira Pinho Filho<sup>b</sup>, Maria Elisa Quezado Lima Verde<sup>c</sup>, Priscila Macêdo França da Silva<sup>d</sup>, Ilanna Mara Gomes Estanislau<sup>e</sup>, Isabelly Vidal do Nascimento<sup>f</sup>, Antonio Ernando Carlos Ferreira Júnior<sup>g</sup>, Joyce Ohana de Lima Martins<sup>h</sup>, Paulo Goberlânio de Barros Silva<sup>i</sup>, Fabrício Bitu Sousa<sup>j</sup>, Mário Rogério Lima Mota<sup>k</sup>, Ana Paula Negreiros Nunes Alves<sup>l</sup>.

<sup>a</sup> Graduado em Odontologia pelo Centro Universitário Christus, Mestre e Doutorando em Odontologia pela Universidade Federal do Ceará (UFC); <sup>b</sup> Graduado em Odontologia pela UFC, Mestre e Doutorando em Odontologia pela UFC; <sup>c</sup> Graduada em Odontologia pela UFC, Mestra e Doutora em Odontologia pela UFC; <sup>d</sup> Graduada em Odontologia pela UFC e Mestra em Odontologia pela UFC; <sup>e</sup> Graduada em Odontologia pela UFC e Mestra em Odontologia pela UFC; <sup>f</sup> Graduada em Odontologia pela UFC, Mestra e Doutora em Odontologia pela UFC; <sup>g</sup> Graduado em Odontologia pela UFC, Mestre e Doutor em Odontologia pela UFC; <sup>h</sup> Graduada em Odontologia pelo Centro Universitário Christus, Mestra e Doutoranda em Odontologia pela Universidade Federal do Ceará (UFC); <sup>i</sup> Graduado em Odontologia pela UFC, Mestre e Doutor em Odontologia pela UFC. <sup>j</sup> Graduado em Odontologia pela Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Doutor em Odontologia pela Universidade de São Paulo (USP) e Pós-doutorado pela Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP); <sup>k</sup> Graduado em Odontologia pela Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Mestrado em Ciências Fisiológicas pela Universidade Estadual do Ceará (UECE) e doutor em Farmacologia pela UFC; <sup>l</sup> Graduada em Odontologia pela UFC, Mestra em Patologia pela UFC e Doutora em Farmacologia pela UFC.

### RESUMO

**Objetivo:** Este estudo visa apresentar as principais categorias de modelos experimentais *in vivo* em odontologia e suas aplicações na pesquisa pré-clínica, destacando sua importância para o entendimento de doenças bucais e o desenvolvimento de terapias. **Materiais e Métodos:** Foi realizada uma revisão bibliográfica nas principais bases de dados científicas (PUBMED, MEDLINE,

SCIELO, LILACS, COCHRANE) e uma compilação de estudos conduzidos pelo Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal do Ceará. Modelos experimentais, como úlceras orais, carcinogênese, lesões apicais, movimentação dentária induzida, interferência oclusal, exodontia e defeitos ósseos mandibulares foram descritos. Detalhes metodológicos incluem a escolha de animais, procedimentos éticos, e análises histológicas, bioquímicas e moleculares. **Resultados:** Os modelos descritos permitiram a replicação de condições clínicas, como inflamação, reparo ósseo e neoplasias. Exemplos incluem o uso de carcinógenos tópicos para estudos de câncer de boca, modelos de lesão apical para avaliar respostas inflamatórias, e a utilização de mini-implantes para movimentação dentária controlada. Resultados demonstraram alta reprodutibilidade e relevância clínica, com impacto na compreensão de processos como a remodelação óssea e as respostas imunológicas. **Conclusão:** Modelos experimentais são ferramentas indispensáveis na odontologia para o estudo de doenças e terapias em condições controladas. Embora possuam limitações, eles garantem resultados confiáveis para a aplicação clínica, contribuindo significativamente para a ciência translacional. A padronização das metodologias e o respeito aos princípios éticos são essenciais para sua efetividade e aceitação científica.

Palavras-chave: Modelos. Animais. Experimentação Animal.

#### ABSTRACT

**Objective:** This study aims to present the main categories of in vivo experimental models in dentistry and their applications in preclinical research, highlighting their importance for understanding oral diseases and the development of therapies. **Materials and Methods:** A bibliographic review was conducted in major scientific databases (PUBMED, MEDLINE, SCIELO, LILACS, COCHRANE), and a compilation of studies carried out by the Oral Pathology Laboratory of the Federal University of Ceará was made. Experimental models, such as oral ulcers, carcinogenesis, apical lesions, induced dental movement, occlusal interference, exodontia, and mandibular bone defects, were described. Methodological details include animal selection, ethical procedures, and histological, biochemical, and molecular analyses. **Results:** The described models allowed the replication of clinical conditions, such as inflammation, bone repair, and neoplasms. Examples include the use of topical carcinogens for oral cancer studies, apical lesion models to assess inflammatory responses, and the use of mini-implants for controlled dental movement. Results demonstrated high reproducibility and clinical relevance, impacting the understanding of processes such as bone remodeling and immune responses. **Conclusion:** Experimental models are indispensable tools in dentistry for studying diseases and therapies under controlled conditions. Although they have limitations, they provide reliable results for clinical application, significantly contributing to translational science.

Standardization of methodologies and adherence to ethical principles are essential for their effectiveness and scientific acceptance.

Key words: Models. Animal. Animal Experimentation.

## INTRODUÇÃO

O avanço contínuo do conhecimento e a qualidade das novas descobertas, especialmente nas ciências biológicas, são resultado do desenvolvimento e criação da experimentação animal, que permite a constante atualização de procedimentos e técnicas, além de uma abordagem mais padronizada para o ganho de mais conhecimento (1-2).

Em meados de 1865, Claude Bernard revelou os princípios do uso de animais como modelo de estudo em suas pesquisas sobre fisiologia. O trabalho intitulado “Introdução ao Estudo da Medicina Experimental” buscou determinar os princípios para um estudo experimental na medicina. Em 1868, Charles Sanders Peirce, fundador do pragmatismo, estabeleceu a importância do uso de modelos animais para visualizar melhor os processos a serem estudados. Posteriormente, em 1927, Percy W. Bridgman escreveu em seu livro “A Lógica da Física Moderna” que os modelos são ferramentas de pensamento úteis e inevitáveis, que nos permitem decifrar o não familiar a partir do familiar (1).

Segundo Fagundes et al. (3), eventos químicos e físicos podem ser desencadeados em animais para verificar alterações em doenças humanas. Sua proposta ressalta a utilidade da experimentação animal para o entendimento dos processos patológicos nos humanos. Um dos objetivos dos modelos experimentais é identificar um procedimento ou técnica que permita compreender profundamente os mecanismos que reproduzem os dados (1). Essencialmente, os modelos podem ser considerados uma implementação de uma parte da realidade, pois reproduzem um evento (2).

O estabelecimento de modelos experimentais contribui para o entendimento de eventos naturais, principalmente fenômenos relacionados à ciência médica. Como resultado, pode-se compreender a fisiologia da patogênese das doenças, ação de medicamentos ou consequências de intervenções cirúrgicas. No entanto, esses modelos devem ser o mais semelhantes possível às condições que estão imitando (3).

As respostas humanas às doenças não podem ser simuladas de forma fiel. Como resultado, modelos experimentais ideais não existem. No entanto, cada modelo contribui de maneira única para o acúmulo de conhecimento sobre o processo biológico do objetivo estudado (ou seja, uma doença ou seu possível tratamento) (4).

Além de toda a organização necessária para a realização dos experimentos, questões éticas são fundamentais para a execução desses estudos. A Lei 11.794 foi aprovada no Brasil em 8 de outubro de 2008, após trâmite de 13 anos,

regulamentada pelo Decreto 6.899, em 15 de julho de 2009, o que levou à implantação do CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e das CEUAS - Comissões de Ética no Uso de Animais, estabelecendo procedimentos e responsabilidades para o uso de animais de laboratório (5). Em 2 de fevereiro de 2016, o CONCEA publicou uma resolução normativa (No. 30) sobre os Cuidados e Uso de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica, atualizando as diretrizes para os pesquisadores (6). Todos os experimentos para o desenvolvimento de modelos seguem as diretrizes do ARRIVE® implementadas pela resolução NC3R e têm como objetivo melhorar a análise, o design e a execução dos estudos com animais, expandir as informações a serem publicadas e reduzir o uso excessivo de animais.

A qualidade dos estudos na fase pré-clínica, essencial para a transição para os seres humanos, depende consideravelmente da adequação dos modelos animais. De fato, na área da Odontologia, diversos modelos experimentais têm sido propostos para melhor atender a esse objetivo. O desenvolvimento e uso de biomateriais, principalmente em odontologia, endodontia e cicatrização óssea; melhoria de técnicas e protocolos cirúrgicos; e o manejo e tratamento da dor orofacial são exemplos de alvos de pesquisa que podem ser aplicados no sistema estomatognático de animais (6-7).

Nesta revisão, objetivamos descrever mais de 10 anos de experiência de trabalho utilizando modelos animais para abordar diferentes alvos no estudo de alterações bucais.

## **OBJETIVO(S)**

Objetivos gerais:

- Descrever e analisar modelos experimentais in vivo em odontologia, com foco em suas aplicações na pesquisa pré-clínica.
- Avaliar a contribuição desses modelos para o desenvolvimento de novas terapias odontológicas.

Objetivos específicos:

- Identificar as principais aplicações dos modelos de úlceras orais, carcinogênese, lesões apicais, movimentação dentária induzida, interferência oclusal, exodontia e osteonecrose.
- Analisar as metodologias e protocolos utilizados em cada modelo.
- Avaliar a reprodutibilidade e a relevância clínica desses modelos na compreensão das doenças bucais.
- Examinar o impacto dos modelos de exodontia e movimentação dentária na cicatrização óssea.
- Propor o uso de simulações biofísicas e matemáticas para reduzir o uso de animais em pesquisas odontológicas.

## DESCRIÇÃO DOS MODELOS EXPERIMENTAIS

### Modelo Experimental de Úlceras Orais:

O modelo de úlceras orais é utilizado para avaliar os mecanismos envolvidos no processo inflamatório agudo e no reparo de úlceras traumáticas orais, uma condição frequente nas clínicas odontológicas. Este modelo também pode ser usado para determinar a eficácia de diversos fármacos ou moléculas que auxiliem no processo de reparo. Isso ocorre porque ainda não há consenso sobre qual seria o melhor tratamento. A resposta cicatricial em doenças crônicas, como diabetes mellitus, ou o uso de medicamentos de longa duração, como aqueles indicados para pacientes com doenças autoimunes, também pode ser avaliada. O modelo pode ser utilizado em várias espécies de animais, como ratos, camundongos, coelhos e esquilos, e a proporção da úlcera em relação ao tamanho do animal deve ser avaliada.

O modelo de lesão desenvolvido pela nossa equipe foi publicado pela primeira vez por Cavalcante et al. (8). Este modelo envolve o uso de um demarcador e lâmina de bisturi ou punch dermatológico (9), cujo diâmetro depende da espécie animal; esse instrumento é usado para induzir dano na mucosa jugal. Em ratos Wistar, um punch dermatológico de 6 a 8 mm de diâmetro resulta em uma lesão padrão. A área restante na mucosa deve sempre ser excisada com uma lâmina de bisturi nº 15. O padrão desta técnica deve ser o mesmo para todos os animais e realizada pelo mesmo operador. Antes do procedimento, os animais são anestesiados devido ao grau de invasividade (GI 2) conforme as diretrizes do CONCEA (NR30). (Figura 1A)

O tempo para a geração da úlcera varia de acordo com o número de animais em cada grupo e a habilidade do operador; em média, o operador leva 3 minutos por animal. Os animais são então monitorados por 10 dias para avaliar a cicatrização total da ferida. No entanto, quando o objetivo do estudo é avaliar a cicatrização da úlcera associada a outras doenças sistêmicas, o experimento pode ser estendido até 28 dias.

As medições da úlcera podem ser feitas usando vários métodos. Uma técnica envolve o uso de um paquímetro digital, que mede os maiores e menores diâmetros para o cálculo da área ( $A = \pi \cdot r \cdot R$ ). Os animais são gradualmente eutanasiados de acordo com o processo que está sendo investigado. Após a eutanásia, o segmento ou cicatriz mucosa ulcerada deve ser excisado e fixado em produtos químicos adequados, dependendo da análise desejada.

### Modelo Experimental de Carcinogênese Oral:

O câncer oral é uma das neoplasias malignas mais prevalentes no mundo, com alta incidência e mortalidade (10). O modelo de câncer oral é útil para estudar os processos envolvidos na carcinogênese e o desenvolvimento de fármacos com atividade preventiva e/ou terapêutica contra o carcinoma de células escamosas oral. Isso ocorre porque o tratamento dessa neoplasia é cirúrgico, muitas vezes mutilante, ou associado à radioterapia.

Os animais selecionados, como ratos, camundongos ou esquilos devido ao seu pequeno tamanho, recebem uma aplicação tópica de uma solução 0,5% de 4-NQO (11) na superfície dorsal da língua usando microbrushes ou cotonetes estéreis. Antes da administração, o carcinógeno é dissolvido em 4% de DMSO em uma capela de segurança biológica, permitindo a renovação de 100% do ar e evitando a fuga da substância tóxica para o laboratório. O carcinógeno é então administrado três vezes por semana, em dias alternados, durante 4, 12, 16 e 20 semanas (12); o período de administração pode ser adaptado conforme o objetivo de cada estudo.

Os microbrushes ou cotonetes embebidos em 5 µL de solução (0,5% de 4-NQO) são esfregados suavemente na lateral direita do dorso da língua por 10 segundos, sem cruzar a linha média. Os animais são imobilizados manualmente para essa aplicação e a cavidade oral é aberta usando um abridor de boca feito com cliques de alumínio tamanho 10/0, liberando a língua do animal. (Figura 1B)

A eutanásia é realizada de acordo com os princípios éticos, e os tecidos removidos são embalados em fixadores, dependendo da análise. Mudanças morfológicas, reações imuno-histoquímicas, dosagem de citocinas, pesquisa de proteínas e técnicas de biologia molecular, entre outras, podem ser realizadas. Órgãos podem ser coletados para análise morfológica de toxicidade e o sangue pode ser coletado para estudar os parâmetros bioquímicos. Os parâmetros podem ser avaliados após punção na cauda com tubos capilares de calibre proporcional à vasculatura dos roedores utilizados.

### **Modelo Experimental de Lesão Apical:**

A periodontite apical é uma condição de origem inflamatória associada aos dentes. A periodontite apical tem alta prevalência e sua patogênese envolve uma resposta à necrose da polpa frente a inúmeros agentes etiológicos, sendo a forma mais frequente a cárie dentária. Como essa condição provoca alterações na resposta imunológica local, um modelo experimental é crucial para avaliar os processos envolvidos nesta condição (13).

Após anestesia (grau de invasividade 2) e posicionamento dos animais, as polpas dos primeiros molares inferiores direitos são expostas com uma broca de carbureto ¼ de diâmetro (JET®, Ontario, Canadá), com alta rotação e sem resfriamento.

A broca é ativada até que seu diâmetro completo preencha a câmara pulpar. Em seguida, a câmara pulpar é inspecionada com uma lima endodôntica tipo Kerr série especial número 06 (Dentsply-Maillefer®, Ballaigues, Suíça). Os dentes cavitados ficam expostos ao meio bucal ao longo do experimento. A lesão apical geralmente está bem estabelecida a partir do 14<sup>o</sup> dia, progredindo até o último dia experimental (14). (Figura 2A)

Após a eutanásia, realizada de acordo com os princípios éticos estabelecidos, as hemimandíbulas são removidas cirurgicamente. O excesso de tecido mole é retirado e armazenado em formol neutro a 10% por 48 h para análise radiográfica e confecção de lâminas histológicas. Vale ressaltar que as mandíbulas podem

ser excisadas com outros fixadores ou conservantes, dependendo da análise proposta.

### **Modelo Experimental de Movimentação Dentária Induzida com Ancoragem Esquelética:**

A Movimentação Dentária Induzida (MDI) é uma prática comum na rotina odontológica e pode ser realizada em crianças, jovens e adultos. Conhecer as repercussões do movimento ortodôntico em pacientes com doenças crônicas, neoplasias malignas e/ou aqueles que utilizam medicamentos anti-reabsortivos ou anti-angiogênicos é importante, pois o movimento ortodôntico está diretamente envolvido no processo de remodelação óssea.

Ratos são utilizados como modelos para MDI, especialmente o movimento mesial do primeiro molar superior (15,16). No modelo mais utilizado, introduzido por Heler et al. (17), o incisivo central superior do animal é usado como ponto de ancoragem para o movimento dentário, com pouca ou nenhuma resistência a reações indesejadas e alterações na força inicialmente aplicada.

Um dos objetivos do modelo experimental de MDI com ancoragem esquelética é evitar movimentos inesperados durante a mesialização do primeiro molar superior, além de obter forças mais constantes.

Dispositivos Temporários de Ancoragem (DTA), chamados mini-implantes, do tipo auto-perfurante sem perfil transmucoso, são empregados, com 1,4 x 6,0 mm (Sin®), e são instalados com auxílio de uma chave de mão (Sin®) a uma distância de aproximadamente 2 mm da região distal do incisivo superior direito. Antes da aplicação das forças ortodônticas, os animais são anestesiados (GI 2 – CONCEA), e um abridor de boca é instalado para facilitar o acesso à cavidade oral do animal durante os procedimentos operatórios. Uma mola fechada de Níquel-Titânio (Niti) de 6 mm (Morelli®, Sorocaba, SP) é então posicionada entre o primeiro molar superior esquerdo (1° MSE) (ponto de aplicação da força) e o mini-implante (ponto de ancoragem), permitindo a mesialização do dente. Ao distender a mola, uma calibração inicial padronizada de força de 50 gF é induzida em todos os grupos experimentais utilizando um dinamômetro ortodôntico (Morelli®, Sorocaba, SP).

Para ativar a mecânica de movimentação do primeiro molar superior esquerdo, um fio de aço inoxidável 0,020" (Morelli®) é instalado abaixo da ameia distal no sentido lingual para vestibular, utilizando um porta-agulha (Mathieu, Golgran®). O fio deve circundar a região cervical do dente, fixando-o a uma das extremidades da mola, e então ser distendido. A porção livre da mola de seção fechada instalada no primeiro molar superior esquerdo, conforme descrito, também foi ajustada com um fio de amarrilho que passa pelo orifício localizado na cabeça do mini-implante e é então distendido.

Ao final da instalação do dispositivo, os animais são observados e seus sinais vitais são medidos. Após a recuperação da anestesia, os animais são alojados em caixas e recebem ração em pó nas primeiras 48h. Após o período experimental, que pode durar até 28 (vinte e oito) dias, os animais são eutanasiados de acordo com os princípios éticos estabelecidos. (Figura 2B)

A mandíbula superior pode ser removida, e ambos os lados podem ser usados em uma análise: o lado com movimento do molar (esquerdo) e o contralateral (controle). O suporte ósseo do mini-implante também é removido. As seções são então fixadas em formol neutro a 10%, descalcificadas com 10% de EDTA por 30 dias, observadas semanalmente e preparadas para coloração com hematoxilina-eosina (HE).

Para análises de imagem, radiografias digitais e/ou microtomografia, as medições devem ser obtidas antes das amostras serem descalcificadas. A região óssea que continha o mini-implante também pode ser analisada de forma complementar, dependendo do objetivo do estudo. Pode-se medir o espaço resultante da MDI entre o primeiro e o segundo molar superior esquerdo utilizando paquímetros ou uma fita histológica (Zeiss®). Além disso, uma análise do primeiro molar superior esquerdo em relação aos fenômenos pulpares e periodontais resultantes da MDI pode ser realizada (18).

### **Modelo Experimental de Interferência Oclusal:**

A dor é um sintoma incapacitante, e o desconforto na região orofacial pode ter diversas etiologias e é bastante prevalente. Modelos experimentais de dor orofacial podem nos permitir entender o papel das moléculas nas diferentes cascatas, e possibilitar o estudo de fármacos ou dispositivos com ação analgésica. Além disso, a presença de condições sistêmicas e/ou o uso de medicamentos que alteram a sensibilidade à dor pode ser avaliada utilizando este modelo.

A maioria dos modelos de estudo de dor envolve a injeção de compostos, como formalina ou carragenina, nos tecidos da região orofacial. Interferências oclusais podem ser simuladas para alinhar este modelo com aquele observado nas clínicas odontológicas.

Após anestesia (GI 2/CONCEA), os animais são colocados em uma mesa cirúrgica na posição de decúbito ventral com abertura máxima da boca utilizando um abridor de boca feito e adaptado a partir de um clipe número 10/0 de papel. Uma quantidade de ácido fosfórico a 37% (FGM®), suficiente para cobrir toda a superfície oclusal dos molares, é aplicada na superfície oclusal dos molares superiores esquerdos pelo tempo indicado pelo fabricante (40"). Em seguida, o ácido é lavado com uma gaze embebida em água destilada e secado com uma gaze estéril. O sistema adesivo escolhido (Adper Single Bond, 3M®) pode então ser aplicado em duas fases.

Uma camada fina de resina composta fluida (Opallis Flow, FGM®) deve ser acomodada na superfície oclusal dos molares superiores esquerdos, e o dispositivo de interferência oclusal deve ser pressionado e acomodado com o auxílio de uma pinça clínica.

Este instrumento de interferência é feito de resina composta (Z350 3M®) em um único incremento com forma e medida padrão de 100 x 20 x 1,3 mm (comprimento x largura x espessura). O dispositivo é inserido manualmente, e a fotopolimerização final (40") é realizada. (Figura 2C)

Ao final da instalação do dispositivo, as pinças são usadas para verificar se o dispositivo está bem adaptado e estável com movimentos leves de um lado para o outro. Os animais são monitorados diariamente por 7 dias para garantir que o dispositivo permaneça fixado com a resina.

Os gânglios trigêmeos esquerdos e direitos são excisados cirurgicamente após a duração do experimento e fixados em formol tamponado a 10% para posterior processamento histológico. Tecidos de suporte dentário e análises comportamentais, como o número de mordidas e arranhões na região das vibrissas dos animais e o uso da Escala de Grimace para classificar o nível de dor e sofrimento, também podem ser realizadas (19).

#### Modelo Experimental de Exodontia:

A extração induz uma lesão pós-traumática no alvéolo, incitando o processo inflamatório e, conseqüentemente, a cicatrização e reparo. Este modelo é utilizado para estudar possíveis interferências de diferentes condições locais, sistêmicas ou medicamentosas no processo de remodelação óssea, e pode ser empregado para avaliar os mecanismos de aceleração da cicatrização tecidual.

Para isso, é utilizado o primeiro molar inferior esquerdo ou direito (a critério do pesquisador), já que a extração dos molares superiores em roedores pode levar a um maior número de fraturas devido à divergência acentuada das raízes, inferindo um possível viés de cicatrização.

Os animais foram anestesiados (GI 3/CONCEA) e a sindesmotomia foi realizada com o auxílio de uma sonda exploradora. O movimento de luxação foi realizado com a espátula Hollembach 3S, e o dente foi removido com a espátula Lecron Zalle utilizando movimentos de alavanca. A espátula Hollembach 3S pode auxiliar no processo de remoção do dente (Figura 3A).

O tempo cirúrgico deve ser registrado e o número de fraturas contado. Os dentes removidos, após limpeza e secagem, também são pesados em balança de precisão para padronizar a técnica cirúrgica. Após a eutanásia, realizada conforme os princípios éticos estabelecidos, a hemimandíbula é excisada cirurgicamente e armazenada em substâncias fixadoras para um processo subsequente de descalcificação utilizando ácidos fortes ou quelantes de cálcio, dependendo dos objetivos da análise (20).

Vale ressaltar que, se o pesquisador optar por realizar análises de imagem, a extração deve ser realizada antes do início do processo de descalcificação das amostras.

#### **Modelo Experimental de Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Bisfosfonatos:**

A osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos está cada vez mais prevalente na população devido ao uso constante de bisfosfonatos e outros fármacos anti-reabsortivos e anti-angiogênicos. No entanto, as opções terapêuticas para prevenir, atenuar ou tratar essa condição ainda são incertas devido à falta de conhecimento sobre sua patogênese.

O modelo de osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos pode ser estabelecido utilizando camundongos e ratos, que são anestesiados durante o protocolo, apenas no momento da extração (3 IM/CONCEA). Os animais recebem três administrações semanais consecutivas (dias 0, 7 e 14) de Ácido Zoledrônico (ZA) (apresentação comercial: 0,8 mg / mL / ampola) na concentração de 0,2 mg/kg. Após um mês (dia 42), a extração dos primeiros molares é realizada conforme a técnica descrita para extração experimental. Sete dias depois (dia 49), uma dose adicional de ZA é administrada e, um mês depois (dia 70), os animais são eutanasiados de acordo com os princípios éticos estabelecidos (21). (Figura 3B)

Após a excisão das hemimandíbulas, o tecido mole aderido é removido e colocado em frascos com fixadores para um processo subsequente de descalcificação com um agente quelante orgânico, ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA; pH ajustado para 7,4) por aproximadamente 30 dias em ratos e 15 dias em camundongos. Para análises que não serão realizadas em hemimandíbulas descalcificadas, estas devem ser embaladas em agentes preservativos indicados para cada técnica específica. Análises imaginológicas (radiografias ou tomografias) devem ser realizadas antes do processo de descalcificação.

### **Modelo Experimental de Defeito Ósseo no Ângulo da Mandíbula:**

Os ossos gnáticos são representados pela maxila, que é essencialmente um osso esponjoso, e pela mandíbula, que é compacta. O processo de remodelação óssea pode sofrer algumas alterações dependendo da estrutura histológica do osso. Nesse contexto, o modelo de defeito crítico no ângulo da mandíbula pode ser utilizado para estudar o comportamento da reparação óssea, especialmente na mandíbula, onde o dano causado pela osteomielite está associado ao uso de fármacos anti-angiogênicos e anti-reabsortivos, quimioterapia e radioterapia.

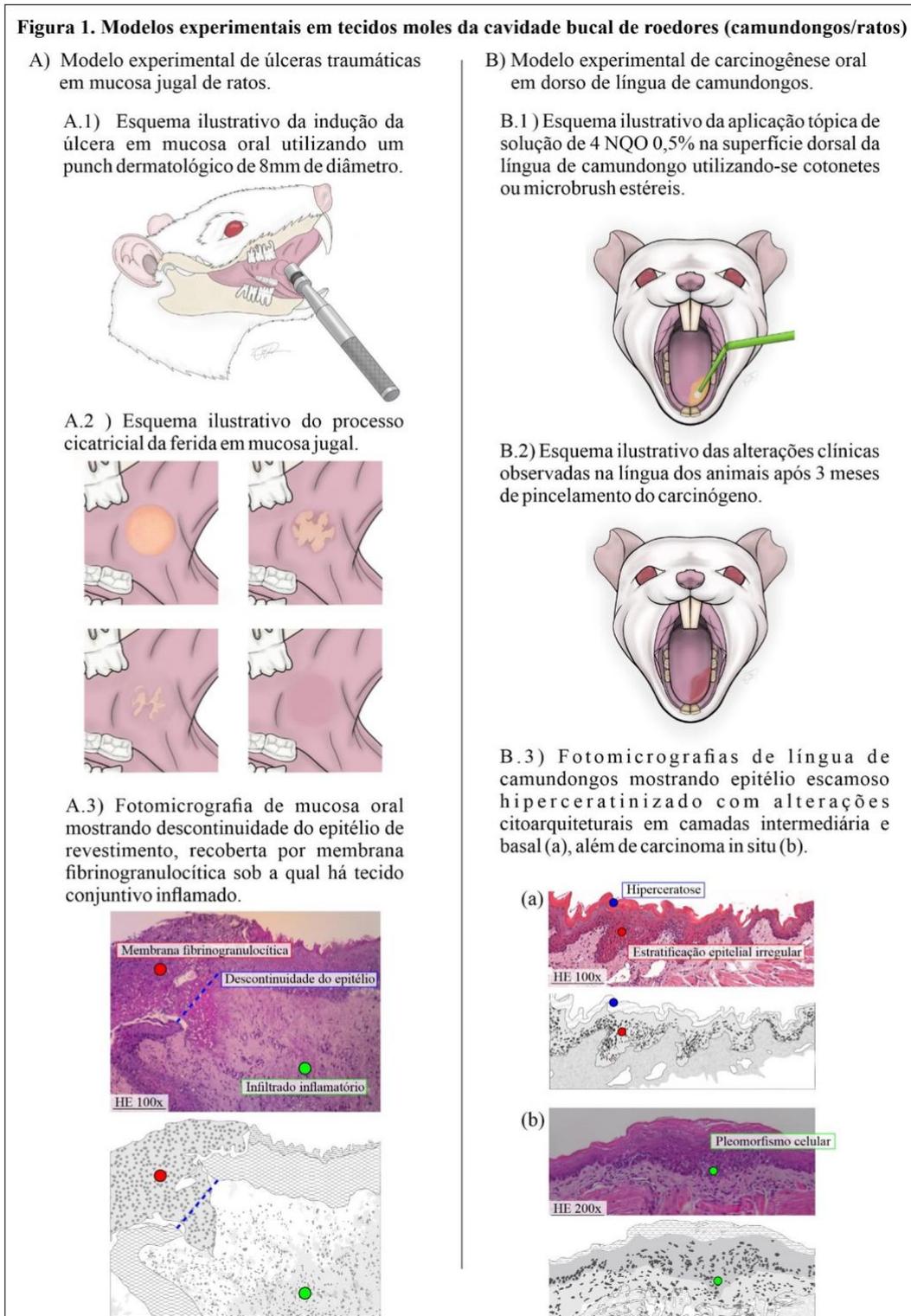
Após anestesia (GI 3/CONCEA), os animais são submetidos à raspagem do ramo da mandíbula e desinfecção com três aplicações de digluconato de clorexidina a 1% em spray (Neba-Sept®). Em seguida, é realizada uma incisão no ângulo da mandíbula utilizando uma lâmina de bisturi nº 15 acoplada a um cabo de bisturi nº 3. A extensão dessa incisão deve ser suficiente para permitir amplo acesso à área a ser operada.

O músculo masseter deve ser afastado para permitir a visualização do ramo mandibular. O defeito bicortical circular é induzido com uma broca de 2 mm (Neodent® Spear) acoplada a um motor Neogrug XT Plus Neodent®, girando a uma velocidade de 1100 rpm por aproximadamente 10 segundos sob irrigação constante com solução salina (Figura 3C).

Após acomodação do material biológico sob estudo, os tecidos moles são reposicionados e a ferida cirúrgica é fechada com uma sutura de nylon para promover a cicatrização. É necessário administrar morfina 0,25 mg/kg por sonda a cada 12h durante três dias para reduzir o desconforto pós-operatório (22). A eutanásia é realizada de acordo com os princípios éticos estabelecidos, e as hemimandíbulas são excisadas cirurgicamente para posterior análise. Os

espécimes são fixados em diferentes substâncias químicas dependendo da metodologia utilizada.

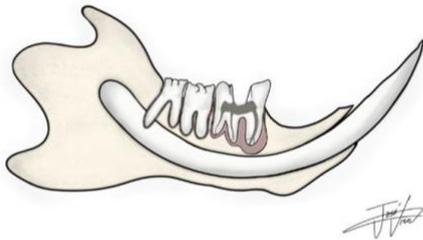
**Figuras:**



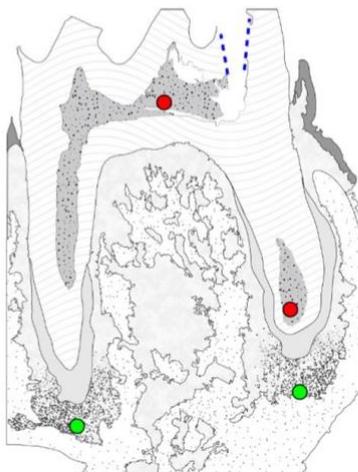
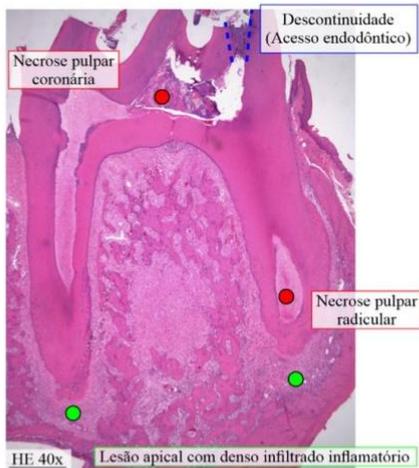
**Figura 2. Modelos experimentais envolvendo tecido osseodentário em cavidade bucal de roedores (camundongos/ratos).**

A) Reprodução de modelo experimental de lesão apical no 1º molar inferior de ratos.

A.1) Esquema ilustrativo da exposição da polpa dentária do 1º molar inferior através de broca do tipo carbide 1/4 de diâmetro com alta rotação sem arrefecimento.

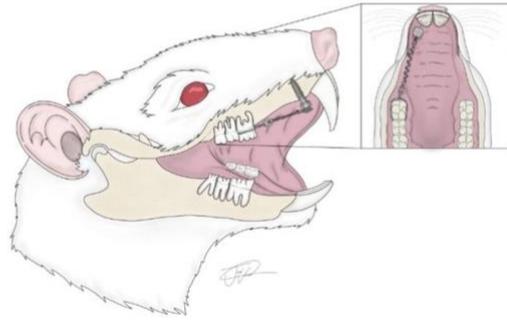


A.2) Fotomicrografia do 1º molar inferior de ratos mostrando acesso endodôntico e necrose pulpar com subsequente envolvimento periradicular e desenvolvimento de lesão apical.

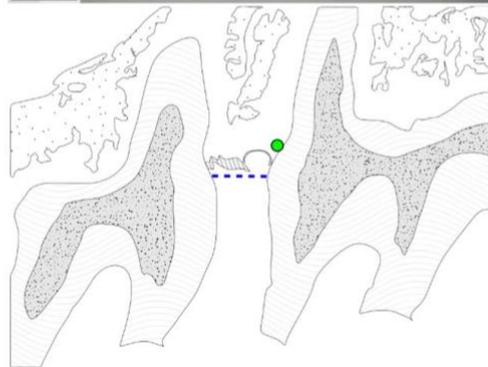
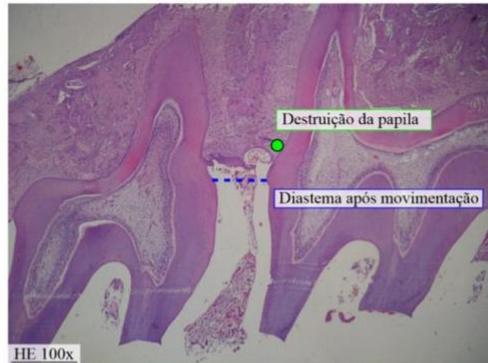


B) Modelo experimental de Movimentação Dentária induzida com ancoragem esquelética em ratos:

B.1) Esquema ilustrativo da instalação do mini-implante a uma distância de 2mm da região distal do incisivo superior direito e mola de níquel-titânio de 6mm entre o 1º molar superior direito e o dispositivo.

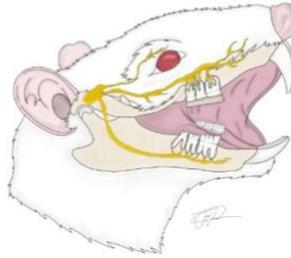


B.2) Fotomicrografia da movimentação dentária entre o 1º molar e 2º molar superiores direitos mostrando espaço inter-radicular e destruição da papila interdental.

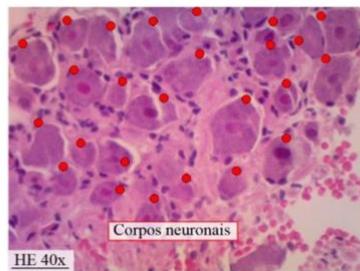


C) Modelo experimental de interferência oclusal em cavidade bucal de ratos.

C.1) Esquema ilustrativo do dispositivo de interferência oclusal confeccionado com resina composta instalado na superfície oclusal dos molares superiores.



C.2) Fotomicrografia de corpos neuronais do gânglio trigeminal com tamanhos variados nos animais submetidos ao modelo de interferência oclusal.



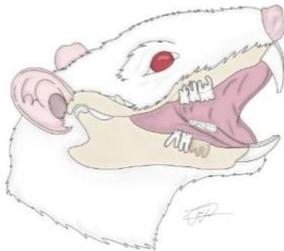
**Figura 3. Modelos experimentais envolvendo tecido ósseo em mandíbula de ratos.**

A) Modelo experimental de Exodontia:

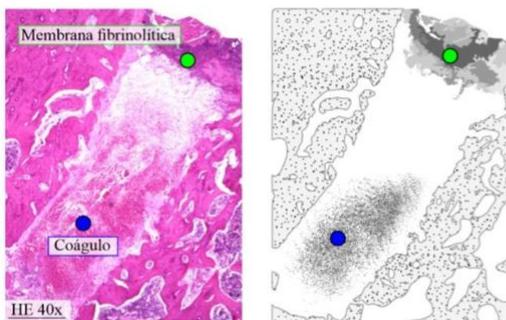
A.1) : Esquema ilustrativo da realização da exodontia do 1o. molar inferior com a auxílio de espátula Lecron Zalle em movimentos de alavanca após sindesmotomia e luxação com sonda exploradora e Holleback 3S.



A.2) Esquema ilustrativo mostrando alvéolo vazio após remoção do dente.

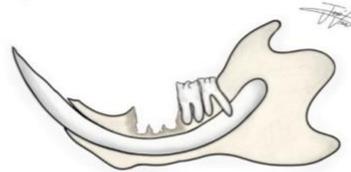


A.3) Fotomicrografia do alvéolo dentário de ratos após exodontia exibindo coágulo recoberto por membrana fibrinolítica.

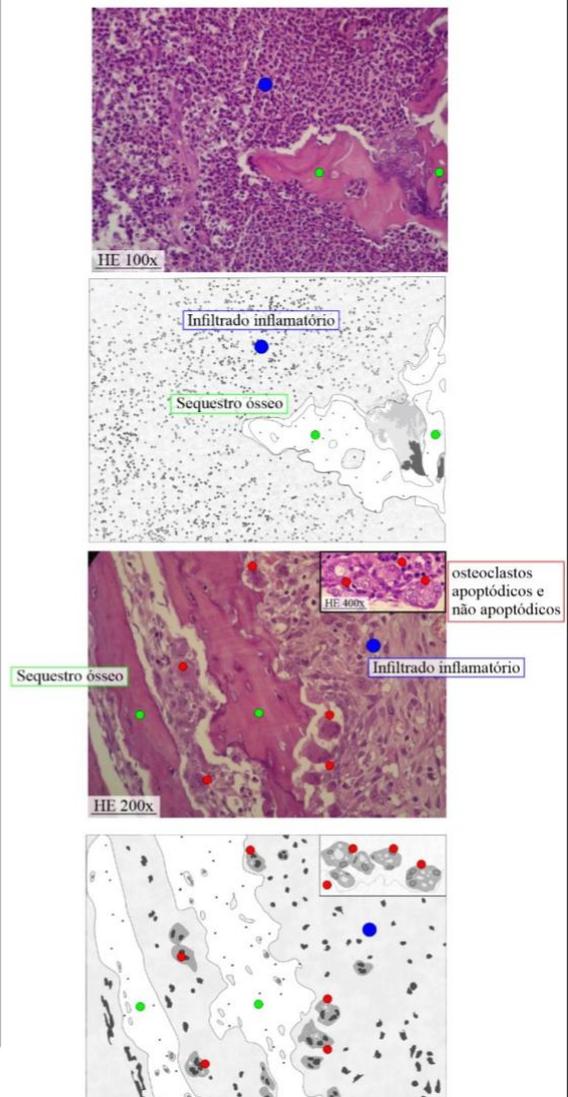


B) Modelo experimental de Osteonecrose dos Maxilares induzida por Bisfosfonatos:

B.1) Esquema ilustrativo de osteonecrose em mandíbula induzida por exodontia após terapia crônica por bisfosfonato.



B.2) Fotomicrografia do sítio de exodontia em mandíbula demonstrando sequestro ósseo em meio a densa exsudação de células inflamatórias.

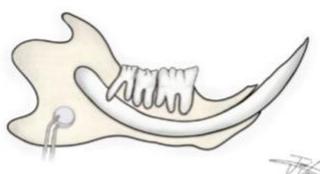


C) Modelo experimental de Defeito Ósseo em ângulo de Mandíbula:

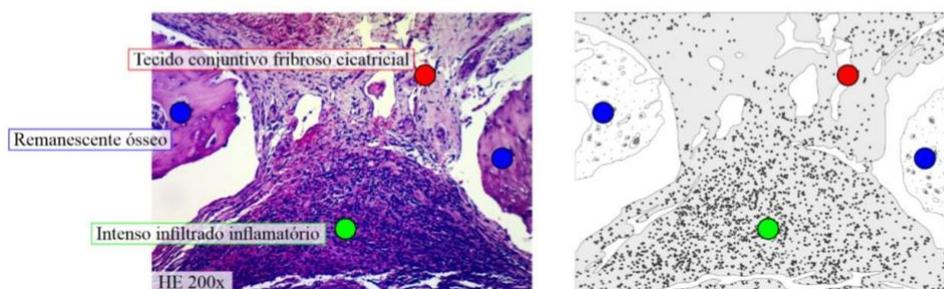
C.1) Esquema ilustrativo da confecção do defeito bicortical circular em ângulo de mandíbula utilizando broca de 2mm unida a motor de implante, após afastamento do músculo masséter.



C.2) Esquema ilustrativo do defeito circular em ângulo de mandíbula.



C.3) Fotomicrografia da área do defeito ósseo exibindo remanescentes ósseos com vitalidade, bilateralmente, entremeados por tecido conjuntivo fibroso e intenso infiltrado inflamatório.



## DISCUSSÃO

Um modelo é um instrumento de imitação que permite o estudo de eventos ou fenômenos. Modelos matemáticos têm sido usados por décadas nas ciências, como meteorologia, biologia e comportamento, possibilitando a investigação de um processo patológico induzido ou espontâneo onde aspectos semelhantes aos dos seres humanos podem ser observados (3).

Um aspecto essencial de um protocolo experimental é a escolha do animal ou cepa. Além das particularidades de cada espécie, como manejo, massa corporal, custo e tamanho, deve-se considerar também as respostas e os efeitos do objeto de estudo (4). Os modelos desenvolvidos e reproduzidos pelo nosso grupo foram realizados com roedores, principalmente ratos e camundongos. Isso ocorre porque esses animais são amplamente utilizados em pesquisas e são pequenos.

Eles também são fáceis de manusear, pois são relativamente domesticados. Além disso, as condições de alimentação e alojamento desses animais podem ser facilmente mantidas, e a reprodução é rápida, permitindo a produção de vários animais. Esses roedores também possuem metabolismo acelerado, o que possibilita resultados rápidos dos processos, e são suscetíveis às mesmas doenças que afetam os humanos, como doenças cardíacas, câncer e diabetes. Por fim, esses animais também podem ser geneticamente modificados para imitar condições ou síndromes específicas (3,4,23,24).

Foi estabelecido um modelo experimental de úlcera traumática na mucosa bucal. Na literatura, outros protocolos foram apresentados para induzir úlceras em diferentes locais, sendo o dorso da língua o sítio escolhido (25,26). No entanto, o dorso da língua é recoberto por uma mucosa hiperqueratinizada, o que teoricamente exigiria meios mais agressivos para induzir a lesão. De acordo com Fitzpatrick et al. (27), as úlceras orais são mais comuns na mucosa jugal e na gengiva, corroborando a importância do nosso modelo, que busca imitar a situação clínica frequente de pacientes com "aftas" na "bochecha". A técnica proposta, de baixo custo e facilmente reproduzível, também é importante. Essa técnica requer apenas um demarcador e lâmina de bisturi (8) ou um punch dermatológico (9), na maioria dos casos, com diâmetro de 8 mm para criar a úlcera com resultados satisfatórios. No entanto, outros pesquisadores optaram por usar biópsias por punção no dorso da língua com diâmetro de 3 mm para a formação das úlceras (25,26).

A maioria dos estudos publicados onde a carcinogênese oral é induzida em animais com o composto 4-Nitroquinolina 1-óxido (4-NQO) usa a água de beber contendo carcinógenos como método de introdução (28,29,30). Nosso grupo optou pelo modelo de aplicação tópica por fricção, o que permite maior controle da dose administrada, monitoramento das alterações clínicas na iniciação e progressão tumoral, e redução do potencial de lesões em outros órgãos do trato gastrointestinal (esôfago, estômago e intestino). Um estudo publicado por Gannot et al. (11) revelou que o carcinógeno utilizado na água de beber interferiu na resposta imunológica ao redor do tumor e nas respostas sistêmicas. Vários estudos sobre carcinogênese oral usando 4-NQO diluído em propilenoglicol nas concentrações de 0,5% e 1% administraram a solução na mucosa palatina do ventre da língua três vezes por semana (11,12,31,32). No entanto, utilizamos uma solução de DMSO 4% para diluir o carcinógeno devido à maior difusão dessa substância no tecido epitelial, o que pode potencializar a ação do 4-NQO. As aplicações tópicas também foram realizadas três vezes por semana, como descrito acima.

O modelo de periodontite apical foi induzido por reprodução, com adaptações do modelo original de Delivanis et al. (33). No modelo original, os pesquisadores usaram dentes de gatos domésticos, severando as coroas acima da área cervical e fazendo um acesso amplo com brocas Gates Glidden e instrumentação com limas Hedstron (33). Devido às atualizações das Comissões Éticas de Uso de Animais e às diretrizes internacionais para testes com animais, a linhagem utilizada neste estudo já não é mais permitida para experimentação. Além disso, com a modernização dos instrumentos endodontológicos, a técnica utilizada no

modelo proposto por nosso grupo permite maior facilidade de replicabilidade e resultados satisfatórios.

A maioria dos modelos animais de Movimentação Dentária Induzida (MDI) utiliza ancoragem com fios nos incisivos dos animais (34,35,36); no entanto, esses dentes apresentam ancoragem mínima, pois estão em constante erupção (37), o que desestabiliza o fio e gera viés no movimento. Estudos anteriores de Fernandez-González et al. (15), Kaipatur et al. (38) e Kaipatur et al. (39) sobre modelos de MDI com ancoragem esquelética revelaram a segurança associada ao uso de mini-implantes para a mesialização do molar superior associado a molas de níquel-titânio. Nosso grupo reproduziu satisfatoriamente essa técnica com adaptações mínimas, possibilitando um modelo animal ideal para o movimento ortodôntico.

O modelo de interferência oclusal baseia-se no princípio da interferência oclusal e é estabelecido com um dispositivo feito com resina composta acrílica fixada às superfícies oclusais dos dentes dos animais com adesivos após condicionamento ácido. Esta técnica é caracterizada como de baixo custo e adequada para retenção nos dentes. Além disso, imita problemas causados por restaurações mal adaptadas (especialmente excesso de material restaurador), muito comuns na rotina das clínicas odontológicas (40). Vale ressaltar que o modelo de interferência oclusal é rápido, de fácil monitoramento e apresenta resultados satisfatórios no estudo da dor.

Modelos experimentais de extração do incisivo maxilar foram descritos na literatura (41,42), mas diferem do descrito neste estudo, onde o molar mandibular é removido, pois os incisivos dos roedores crescem continuamente. Este dente é escolhido porque é multirradicular e, portanto, possui uma área óssea maior, permitindo um estudo mais apropriado da cicatrização e da interferência de diferentes medicamentos no metabolismo do tecido ósseo. O modelo publicado por nossa equipe revela a uniformidade da técnica, pois os dentes são pesados para excluir a interferência de seu tamanho durante a cirurgia, o tempo da cirurgia é monitorado para reduzir o viés temporal, e é realizado pelo mesmo operador. A escolha dos animais também é sempre feita de forma aleatória (20).

Estudos recentes que abordam modelos de osteonecrose maxilar induzida por bisfosfonatos associam esses medicamentos com outras drogas para o início da osteonecrose, interferindo, assim, na patogênese real da doença e enfraquecendo a confiabilidade do modelo (43,44). Para evitar esse viés potencial no modelo desenvolvido por nosso grupo, uma análise de dose-resposta foi realizada com o ácido zoledrônico para determinar a dose ideal para indução da necrose óssea associada exclusivamente ao bisfosfonato. Os resultados encontrados revelaram a credibilidade dos achados e, conseqüentemente, do modelo (21). Assim, a replicação desse modelo permite estudos sobre a patogênese da lesão por meio do uso de substâncias bloqueadoras das diferentes fases do processo inflamatório, bem como de marcadores bacterianos.

Poucos estudos estabeleceram modelos experimentais utilizando defeitos críticos na mandíbula, destacando, assim, a importância da pesquisa realizada por nossa equipe. A maioria dos modelos disponíveis na literatura é realizada na

calvária como sítio de envolvimento, com metabolismo ósseo diferente dos ossos gnáticos e interferência das meninges (45,46,47). O modelo proposto por nosso grupo é mais fácil de replicar. Além disso, até o momento, o desenvolvimento de defeito ósseo crítico na mandíbula, exceto o mencionado, não foi alcançado (22).

Os modelos descritos neste estudo são indispensáveis para a pesquisa e já possibilitaram a publicação de inúmeros artigos, dissertações de mestrado e teses de doutorado. Além disso, editais já foram contemplados com projetos de pesquisa utilizando modelos desenvolvidos e/ou reproduzidos com adaptações pelo Laboratório de Patologia Bucal do Curso de Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

## CONCLUSÃO

O uso de modelos experimentais é facilmente justificado, pois, apesar de suas limitações, eles permitem uma avaliação in vivo e estudos pré-clínicos confiáveis, essenciais para o conhecimento do processo saúde-doença de diversas morbidades e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de terapias específicas e direcionadas. O futuro próximo das simulações biofísicas e matemáticas reduzirá o uso de animais de laboratório. No entanto, com base nos métodos disponíveis para estudar a fisiopatologia das doenças humanas, o uso de modelos animais ainda oferece a maior segurança para avaliar os processos que ocorrem nos seres humanos.

## REFERÊNCIAS

1. Ferreira LM, Ferreira LRK. Experimental model: historic and conceptual revision. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2003;18:01–03. doi: 10.1590/S0102-86502003001100001.
2. Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ. Experimental models in research. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2005;20:28-34. doi: 10.1590/S0102-86502005000800008.
3. Fagundes DJ, Taha MO. Animal disease model: choice's criteria and current animals specimens. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2004;19(1):59-65. doi: 10.1590/S0102-86502004000100010.
4. Argenta R, Pereira AH. Modelos animais de aneurisma de aorta. *Jornal Vascular Brasileiro*. 2009;8(2):148-153. doi: 1590/S1677-54492009000200009.

5. Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LFP. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2010;56(1):103-111. doi: 10.1590/S0104-42302010000100024.
6. Franco AL, Nogueira MNM, Sousa NGK, Frota MF, Fernandes CMS, Serra MC. Pesquisas em animais : uma reflexão bioética. *Acta Bioethica.* 2014;20(2):247-253. doi: 10.4067/S1726-569X2014000200012.
7. Cavalcanti AL, Lucena RN, Martins VM, Granville-Garcia AF. Characterization of experimental dental research using animals. *Revista Gaúcha de Odontologia.* 2009;57(1):93-98.
8. Cavalcante GM, Paula RJS, Souza LP, Sousa FB, Mota MRL, Alves APNN. Experimental model of traumatic ulcer in the cheek mucosa of rats. *Acta Cirurgica Brasileira.* 2011;26(3):227-234. doi: 10.1590/S0102-86502011000300012.
9. Mesquita KC, Dantas TS, Silva PGB, Rodrigues MIQ, Alves APNN, Mota MRL, Sousa FB. Abatacept treatment impairs the cell migration and wound healing of oral ulcers in rats: Role of interleukin (IL)-1 $\beta$ , -6 and -10 and CD8/CD30 cells. *Life Sciences.* 2020;243:117243. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117243.
10. Boing AF, Antunes JLF, Carvalho MB, Filho JFG, Kowalski LP, Michaluart-Jr P, Eluf-Neto J, Wünsch-Filho V. How much do smoking and alcohol consumption explain socioeconomic inequalities in head and neck cancer risk? *J Epidemiol Community Health.* 2011;65(8):709-714. doi: 10.1136/jech.2009.097691.
11. Gannot G, Buchner A, Keisari Y. Interaction between the immune system and tongue squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline N-oxide in mice. *Oral Oncol.* 2004;40(3):287-297. doi: 10.1016/j.oraloncology.2003.08.008.
12. Barcessat ARR, Huang I, Rabelo GD, Rosin FCP, Ferreira LGV, Luz JGC, Corrêa L. Systemic toxic effects during early phases of topical 4-NQO-induced oral carcinogenesis in rats. *J Oral Pathol Med.* 2014;43(10):770-777. doi: 10.1111/jop.12190.
13. Siqueira-Jr JF, Rôças IN. Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. *J Endod.* 2008;34(11):1291- 1301. doi: 10.1016/j.joen.2008.07.028.
14. Nascimento IVD. Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. 2017:64.

15. Fernández-González FJ, Cañigral A, López-Caballo JL, Brizuela A, Cobo T, Carlos F, Suazo I, Pérez-González Y, Vega JA. Recombinant osteoprotegerin effects during orthodontic movement in a rat model. *Eur J Orthod.* 2016;38(4):379–385. doi: 10.1093/ejo/cjv056.
16. Fracalossi ACC, Santamaria-Jr M, Consolaro MFMO, Consolaro A. Experimental tooth movement in murines: study period and direction of microscopic sections. *Rev. Dent. Press Ortodon. Ortop. Facial.* 2009;14(1):143–157. doi: 10.1590/S1415-54192009000100014.
17. Heller IJ, Nanda R. Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod.* 1979;75(3):239-258. doi: 10.1016/0002-9416(79)90272-0.
18. Estanislau IMG. Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Departamento de Clínica Odontológica. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. 2019:36.
19. Silva PGB, Martins JOL, Praxedes-Neto RAL, Lemos JVM, Machado LC, Carlos ACAM, Alves APNN, Lima RA. Tumor necrosis factor alpha mediates orofacial discomfort in an occlusal dental interference model in rats: The role of trigeminal ganglion inflammation. *J Oral Pathol Med.* 2020;49(2):169–176. doi: 10.1111/jop.12984.
20. Ferreira-Junior AEC, Silva PGB, Oliveira CC, Lima-Verde MEQ, Sousa FB, Mota MRL, Lima-Júnior RCP, Alves APNN. Influence of infliximab therapy on bone healing post-dental extraction in rats. *Arch Oral Biol.* 2020;112:104680. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104680.
21. Silva PGB, Ferreira-Junior AEC, Teófilo CR, Barbosa MC, Lima-Júnior RCP, Sousa FB, Mota MRL, Ribeiro RA, Alves APNN. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Arch Oral Biol.* 2015;60(9):1237-45. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.05.015.
22. Cunha VV, Silva PGB, Lemos JVM, Martins JOL, Freitas MO, Avelar RL. Evaluation of a collagen matrix in a mandible defect in rats submitted to the use of bisphosphonates. *Acta Cir. Bras.* 2020;35(10):e202001005, 2020. doi: 10.1590/s0102-865020200100000005.
23. Souza IMA. Experimental lives: humans and rodents in the lab. *Etnografica.* 2013;17(2):241–268. doi: 10.4000/etnografica.3108.
24. Gobatto CA, Mello MAR, Machado-Gobatto FB, Papoti M, Voltarelli FA, Contarteze RVL, Araujo GG. Avaliações fisiológicas adaptadas à roedores: aplicações ao treinamento em diferentes modelos experimentais. *Rev.Mack. Educ. Fís. Esp.* 2008;7(1):137-147.

25. Wagner VP, Webber LP, Ortiz L, Rados PV, Meurer L, Lameira OA, Lima RR, Martins MD. Effects of Copaiba Oil Topical Administration on Oral Wound Healing: Copaiba Oil on Oral Wound Healing. *Phytother Res.* 2017;31(8):1283-1288. doi: 10.1002/ptr.5845.
26. Coelho FH, Salvadori G, Rados PV, Magnusson A, Danilevicz CK, Meurer L, Martins MD. Topical Aloe Vera (*Aloe barbadensis Miller*) Extract Does Not Accelerate the Oral Wound Healing in Rats: ALOE VERA ON ORAL WOUND HEALING. *Phytother Res.* 2015;29(7):1102-5. doi: 10.1002/ptr.5352.
27. Fitzpatrick SG, Cohen DM, Clark AN. Ulcerated Lesions of the Oral Mucosa: Clinical and Histologic Review. *Head Neck Pathol.* 2019;13(1):91-102. doi: 10.1007/s12105-018-0981-8.
28. Liu YC, Ho HC, Lee MR, Yeh CM, Tseng HC, Lin YC, Chung JG. Cortactin Is a Prognostic Marker for Oral Squamous Cell Carcinoma and Its Overexpression Is Involved in Oral Carcinogenesis. *Environ Toxicol.* 2017;32(3):799-812. doi: 10.1002/tox.22280.
29. Mikki K, Orita Y, Gion Y, Takao S, Ohno K, Takeuchi M, Ito T, Hanakawa H, Tachibana T, Marunaka H, Makino T, Minoura A, Matsukawa A, Nishizaki K, Yoshino T, Sato Y. Regulatory T cells function at the early stage of tumor progression in a mouse model of tongue squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2016;65(11):1401-1410. doi: 10.1007/s00262-016-1902-x.
30. Oghumu S, Knobloch TJ, Terrazas C, Varikuti S, Ahn-Jarvis J, Bollinger CE, Iwenofu H, Weghorst CM, Satoskar AR. Deletion of macrophage migration inhibitory factor inhibits murine oral carcinogenesis: Potential role for chronic pro-inflammatory immune mediators. *Int J Cancer.* 2016;139(6):1379-90. doi: 10.1002/ijc.30177.
31. Kaplan I, Hochstadt T, Dayan D. PCNA in palate and tongue mucosal dysplastic lesions induced by topically applied 4NQO in desalivated rat. *Med Oral.* 2002;7(5):336-343.
32. Tang XH, Knudsen B, Bemis D, Tickoo S, Gudas LJ. Oral Cavity and Esophageal Carcinogenesis Modeled in Carcinogen-Treated Mice. *Clin Cancer Res.* 2004;10:301-13. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-0999-3.
33. Delivanis PD, Fan VS. The localization of blood-borne bacteria in instrumented unfilled and overinstrumented canals. *J Endod.* 1984;10(11):521-4. doi: 10.1016/S0099-2399(84)80136-3.
34. Kaya S, Çifter M, Çekici A, Olgaç V, Issever H, Isik G. Effects of orthodontic force magnitude on cell apoptosis and RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Orofac Orthop.* 2019;81(2):100-112. doi: 10.1007/s00056-019-00205-6.

35. Alnajar HAAM, Groosh DHA. The effects of calcitonin on post-orthodontic relapse in rats. *Clin. and Exp. Dent. Research*. 2020;7(30):293-301. doi: 10.1002/cre2.373.
36. Kunimatsu R, Kimura A, Tsuka Y, Horie K, Yoshimi Y, Awada T, Gunji H, Abe T, Nakajima K, Sakata S, Nakatani A, Tanimoto K. Baicalin inhibits root resorption during tooth movement in a rodent model. *Arch Oral Biol*. 2020;116:104770. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104770.
37. Amaral VF, Lago EAD, Kondo W, Guarita-Souza LC, Francisco JC. Desenvolvimento de modelo experimental de endometriose em ratas. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2009;36(3):250-255. doi: 10.1590/S0100-69912009000300012.
38. Kaipatur NR, Wu Y, Adeeb S, Stevenson TR, Major PW, Doschak MR. Impact of bisphosphonate drug burden in alveolar bone during orthodontic tooth movement in a rat model: a pilot study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2013;144(4):557-67. doi: 10.1016/j.ajodo.2013.06.015.
39. Kaipatur NR, Wu Y, Adeeb S, Stevenson TR, Major PW, Doschak MR. A novel rat model of orthodontic tooth movement using temporary skeletal anchorage devices: 3D finite element analysis and *in vivo* validation. *Int J Dent*. 2014;2014:917535. doi: 10.1155/2014/917535.
40. Botelho AM, Tavano KTA, Azevedo DM, Gomes MC. Most frequent iatrogenies in dentistry: why not avoiding them? *Rev. gaúch. odontol.* (Online). 2011;59(1):19-24.
41. Zied IC, Milazeni LA, Okamoto T, Okamoto R. Estudo histológico do processo de reparo alveolar em ratos após exodontia e pressão com compressa de gaze embebida em solução de peróxido de hidrogênio. *Rev. Odontol. Araçatuba (Impr.)*. 2005;26(1):9-13.
42. Calixto RFE, Teófilo JM, Brentegani LG, Carvalho TLL. Implantation of flakes of castor oil resin in rat dental alveolus. *Pesqui. Odontol. Bras*. 2001;15(3):257-262. doi: 10.1590/S1517-74912001000300013.
43. Adachi N, Ayukawa Y, Yasunami N, Furuhashi, A, Imai M, Sanda K, Atsuta I, Koyano K. Preventive effect of fluvastatin on the development of medication-related osteonecrosis of the jaw. *Scient Repo Nature Res*. 2020;10:5620. doi: 10.1038/s41598-020-61724-6.
44. Nakagawa T, Tsuka S, Aonuma F, Nodai T, Munemasa T, Tamura A, Mukaido T, Kondo Y, Masaki C, Hosokawa R. Effects of metformin on the prevention of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like lesions in rats. *J Prosthodont Res*. 2021;30;65(2):219-224. doi: 10.2186/jpr.JPOR\_2019\_629.

45. Brum IS, Frigo L, Devita RN, Pires JLS, Oliveira VHV, Nascimento ALR, Carvalho JJ. Histomorphometric, Immunohistochemical, Ultrastructural Characterization of a Nano-Hydroxyapatite/Beta-Tricalcium Phosphate Composite and a Bone Xenograft in Sub-Critical Size Bone Defect in Rat Calvaria. *Materials (Basel)*. 2020;13(20):4598. doi: 10.3390/ma13204598.
46. Cruz MA, Fernandes KR, Parisi JR, Vale GCA, Junior SRA, Freitas FR, Sales AFS, Fortulan CA, Peitl O, Zanotto E, Granito RN, Ribeiro AM, Renno ACM. Marine collagen scaffolds and photobiomodulation on bone healing process in a model of calvaria defects. *J Bone Miner Metab*. 2020;38(5):639-647. doi: 10.1007/s00774-020-01102-4.
47. Prisinoto NR, Molon RS, Scardueli CR, Spin-Neto R, Marcantonio RAC, Oliveira GJPL. Alendronate Impairs Healing of Calvaria Critical Defects After Bone Graft with Different Bone Substitute Materials. *J Oral Maxillofac Surg*. 2020;78(12):2184-2194. doi: 10.1016/j.joms.2020.08.022.