

AVALIAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA PERIODONTAL NO RATO WISTAR.

ISABEL POIARES BAPTISTA*; ANTÓNIO SILVÉRIO CABRITA**

RESUMO

Nos estudos in vivo, o modelo de periodontite experimental mais referenciado baseia-se na colocação de uma ligadura em torno do colo dos dentes posteriores, favorecendo a acumulação de placa bacteriana. Os modelos animais mais utilizados são o cão e os primatas não-humanos. O objectivo deste estudo é avaliar histologicamente o modelo de periodontite experimental no rato Wistar. A avaliação das amostras experimentais, baseou-se numa análise histológica dos elementos celulares e da presença de bactérias relacionadas com os defeitos periodontais existentes. Ao fim de 8 dias (grupo I) formaram-se "bolsas gengivais" com um componente inflamatório essencialmente composto por neutrófilos, associada à presença do fio e placa bacteriana a ele aderente. Ao fim de 15 dias (grupo II) formaram-se algumas bolsas periodontais profundas, com perda de inserção, reabsorção óssea alveolar e lesões da furca. As bactérias detectadas colonizam as superfícies radiculares e ósseas profundas. O infiltrado inflamatório continua a ser constituído essencialmente por neutrófilos. Poderemos concluir que o modelo de periodontite experimental no rato Wistar cria defeitos periodontais importantes ao fim de 15 dias.

Palavras-chave: estudos animais; ratos; modelos de patologia; periodontite

ABSTRACT

The best known animal model of experimental periodontitis consists in the placement of a ligature around posterior teeth, creating good conditions for plaque accumulation. The most frequently used animals are Beagle dogs and non-human primates. The aim of this study was to verify histologically this model in the Wistar rat. Periodontal tissues and bacterial presence at the defects were histologically examined at 8 and 15 days, after ligature placement. In the 8-day group, "gingival pockets" were present, with a large presence of neutrophils, and bacterial plaque associated with the ligature. In the 15-day group, periodontal pockets were present, associated with furcation involvement, loss of attachment and bone resorption. There were some microorganisms adherent to the radicular surface, deep in the pockets. The neutrophils were still the more frequent inflammatory cells. This model of experimental periodontitis creates deep pockets in the Wistar rat molars at 15 days.

Key-words: animal studies; rats; disease models; periodontitis

INTRODUÇÃO

A doença periodontal é a mais importante causa de perda dentária no homem adulto. Apesar de ser uma patologia multifactorial, a patogénese da periodontite envolve a presença de factores de retenção de placa bacteriana, que iniciam uma reacção inflamatória local, num

*Assistente de Periodontologia da FMUC, Lab. de Investigação do Departamento de Medicina Dentária da FMUC.

** Professor da FMUC, Lab. de Patologia Experimental, Instituto de Anatomia Patológica – CHPEBD

hospedeiro predisposto, com libertação de mediadores inflamatórios. Daqui resulta a perda de inserção periodontal e a reabsorção do osso alveolar.

Para testar os procedimentos de regeneração periodontal são necessários modelos animais porque a análise histológica é fundamental para se avaliar quantitativamente e qualitativamente os tecidos que se formaram de novo. A avaliação histométrica pode determinar a quantidade de novo cemento, ligamento periodontal e osso alveolar que se formaram após a cirurgia

periodontal regenerativa. Estes estudos dificilmente poderão ser realizados no humano porque no final é necessário remover o dente e os tecidos circundantes para exame histológico. Para além disso, a avaliação correcta de novas terapêuticas, obriga a ter grupos de teste e grupos de controlo, sem tratamento, o que eticamente não é aceitável no humano.

Os modelos animais mais frequentemente usados nos estudos de regeneração animal utilizam o cão e os primatas não humanos, sendo estes últimos os preferidos, já que a anatomia dentária e a fisiologia de cicatrização são muito semelhantes ao que ocorre no homem ⁽³⁾.

Para testar o efeito da terapêutica, as alterações produzidas em animais de laboratório têm que ter as mesmas características dos defeitos existentes no homem. Essas alterações incluem bolsas profundas, perda óssea vertical ou angular, e superfícies radiculares que tenham sido expostas a placa bacteriana.

O modelo de periodontite experimental mais referenciado baseia-se na colocação de fio de sutura em torno do colo dos dentes posteriores, favorecendo a acumulação de placa.

Já foram publicados alguns estudos que utilizam o modelo rato produzindo uma periodontite experimental ^(2, 12, 16, 21).

O objectivo deste estudo é avaliar histologicamente o modelo experimental de periodontite no rato Wistar.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados dez ratos Wistar, fêmeas, com 4 semanas de idade, com 218 a 268 g de peso. Os animais foram colocados em local com controlo da temperatura e receberam água e alimento *ad libitum*. Foram criados dois grupos, de 5 animais cada.

Protocolo de doença periodontal experimental:

Foi utilizado um modelo experimental já descrito anteriormente ⁽¹⁸⁾ de periodontite em ratos, com modificações mínimas. Resumidamente, os animais foram anestesiados com a associação Ketamina/ Xilazina no regime de 9 mg + 1 mg/100gr, respectivamente, por via intramuscular. Recorrendo a uma mesa operatória com cefalosta-

to, imobilizou-se o animal em decúbito dorsal. Colocou-se cirurgicamente um fio de sutura 4/0 (Perma Sharp™ C17, 4/0 black bridged silk – Hu-Friedy®) em torno do colo dos segundos molares superiores, de ambos os quadrantes. O nó do fio de sutura foi colocado na face vestibular, de modo a permanecer infragengival na face palatina e supragengival na face vestibular.

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical sob anestesia geral, ao fim de 8 dias (grupo 1) e 15 dias (grupo 2). Foi excisado o maxilar superior, recolhendo-se os fragmentos a analisar constituídos pelos três molares superiores e tecido periodontal envolvente, um direito e um esquerdo. As peças foram fixadas em formaldeído neutro tamponado a 10%, durante 48 horas. Depois de descalcificadas (ácido fórmico a 5% durante 4 dias), as peças foram processadas para microscopia óptica. Foram efectuados cortes seriados com 6 micra de espessura, com uma orientação vestibulo-palatina. Os cortes foram submetidos às seguintes técnicas de coloração: Hematoxilina-eosina e Brown and Brenn (para visualização de bactérias, Gram positivas e negativas).

A avaliação das amostras experimentais, que se realizou em microscopia óptica simples, baseou-se numa análise qualitativa dos perfis morfológicos dos elementos celulares envolvidos e da presença de bactérias relacionadas com os defeitos periodontais existentes.

RESULTADOS

No dia de sacrifício, todos os animais estavam saudáveis. No grupo I (8 dias) não houve alteração do peso inicial. No grupo II (15 dias) houve uma ligeira redução do peso em todos os animais, mas estatisticamente não significativa.

No grupo I, nenhum animal apresentou sinais macroscópicos de inflamação gengival. Um dos animais não apresentava o fio de sutura no lado esquerdo, pelo que essa amostra não foi considerada. Durante a recolha das amostras experimentais, decorrente de má manipulação, houve uma dilaceração da amostra o que inviabilizou o seu processamento. Assim, neste grupo examinaram-se 8 amostras recolhidas

em todos os animais experimentais.

A avaliação histológica evidenciou o aprofundamento do sulco gengival, de grau muito variável, com migração apical do epitélio junctional, associado a perda de inserção. A porção mais coronal do cemento radicular fica exposta à cavidade oral. Estas alterações foram por nós avaliadas como ligeiras. A gengiva marginal está deformada, evidenciando uma depressão que contém o fio de sutura (fig 1).

Na maior parte das amostras há um epitélio queratinizado, íntegro, que separa o fio de sutura e a placa bacteriana a ele aderente, do tecido conjuntivo subjacente. Este epitélio não tem interdigitações interpapilares. Há um grande infiltrado de células polimorfonucleares na espessura do epitélio e no espaço entre o epitélio e o fio de sutura. O tecido conjuntivo sub-epitelial apresenta uma grande quantidade de células polimorfonucleares (fig 2).

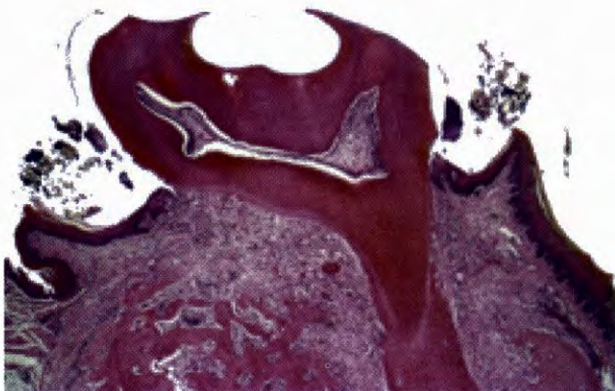


Fig 1 – Lesão periodontal ligeira ao fim de 8 dias de permanência do fio de sutura no colo dentário: aprofundamento do sulco gengival com deformação da gengiva marginal; migração apical do epitélio junctional, associado a perda de inserção. (HE, 40x)

O ligamento periodontal apresenta-se espessado com grande presença de células inflamatórias, principalmente na sua porção mais coronal.

A superfície óssea alveolar apresenta algumas lacunas de reabsorção osteoclástica, tanto na vertente radicular como na vertente gengival. É notória uma diminuição da altura das cristas alveolares, estando aumentada a distância entre a junção amelo-cementária e as cristas alveolares. Ao nível da furca, é visível uma reabsorção óssea ligeira da crista óssea

interradicular.

Em algumas amostras existem algumas zonas de reabsorção do cemento e da dentina radiculares (fig 1).

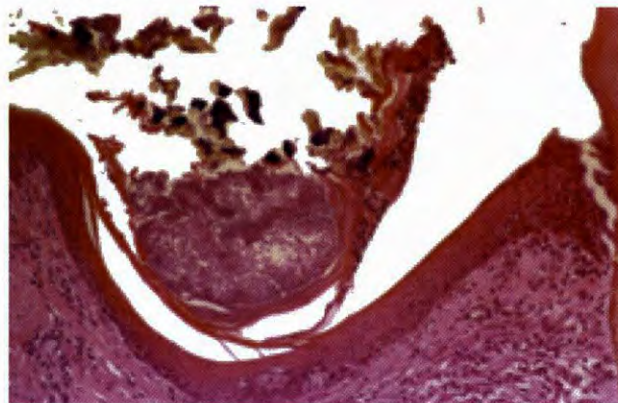


Fig 2 – Área dento-gengival: o epitélio queratinizado do sulco gengival está íntegro, separando o fio de sutura e a placa bacteriana a ele aderente, do tecido conjuntivo subjacente. O tecido conjuntivo sub-epitelial apresenta um infiltrado inflamatório. (HE, 200x)

A detecção de bactérias nas lesões periodontais é positiva, sendo predominantes as bactérias Gram-positivas. Há uma grande acumulação de bactérias em torno dos diversos filamentos que compõem o fio de sutura. A nível da superfície radicular exposta, há alguns aglomerados bacterianos, mas estes são escassos na proximidade dos tecidos moles de inserção periodontal. Não é detectável a invasão dos tecidos gengivais por microrganismos, nem dos túbulos dentinários (fig 3).



Fig 3 - Placa bacteriana em torno do fio de sutura e sobre a superfície radicular. Não é detectável a invasão dos tecidos gengivais por microrganismos, nem dos túbulos dentinários (BB, 200x)

No grupo II, examinaram-se 10 amostras recolhidas nos cinco animais experimentais. Nenhum animal apresenta sinais macroscópicos de inflamação gengival.

A avaliação histológica evidenciou um agravamento das lesões já descritas no grupo anterior. Assim, o sulco gengival apresenta-se aprofundado, com migração apical acentuada do epitélio juncional, associada à perda de inserção periodontal que, em algumas amostras, chega a atingir o terço apical da superfície radicular. Uma grande extensão do cemento radicular fica exposto (fig 4).

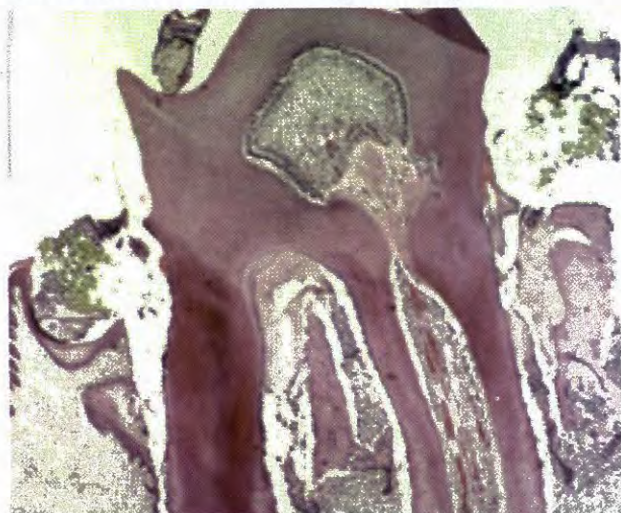


Fig 4 – Lesão periodontal grave ao fim de 15 dias de permanência do fio de sutura na área dento-gengival: perda de inserção periodontal, bolsa periodontal e lesão de furca. (HE, 40x)

A gengiva marginal apresenta-se deformada, evidenciando uma depressão que contém o fio de sutura. Na maior parte das amostras, o epitélio de revestimento gengival apresenta-se íntegro e hiperqueratósico. Há um grande infiltrado de células polimorfonucleares na espessura do epitélio e no espaço entre o epitélio e o fio de sutura. O tecido conjuntivo sub-epitelial apresenta uma grande quantidade de células polimorfonucleares.

O ligamento periodontal apresenta-se muito espessado, sendo predominante a presença de células inflamatórias.

Há uma grande diminuição da altura das cristas alveolares, estando muito aumentada a distância entre a junção amelo-cementária e as cristas alveolares. Nas amostras que eviden-

ciam maior destruição, há uma perda quase total do osso alveolar, só permanecendo a porção mais apical. No tecido ósseo remanescente são visíveis algumas lacunas de reabsorção osteoclástica. Ao nível da furca, é visível a formação de microabscessos, com formação de lesão inflamatória circunscrita e reabsorção óssea da crista óssea interradicular formando, em algumas amostras, lesões de perda de inserção tão extensas que são evidentes furcas permeáveis. A nível das superfícies radiculares, são frequentes as lacunas de reabsorção do cemento e da dentina (fig 5).

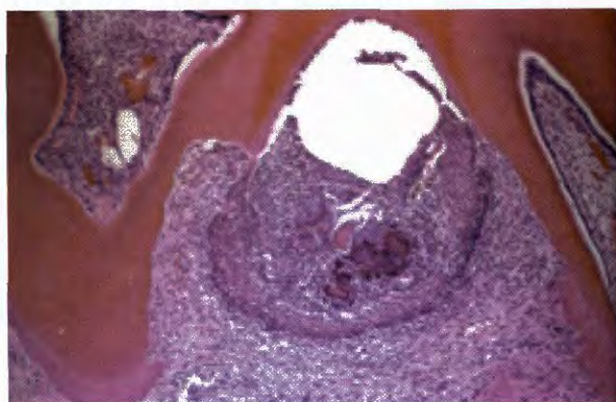


Fig 5 - Lesão na furca interradicular: microabscesso, reabsorção óssea e radicular. (HE, 100x)

É frequente a presença de sequestros ósseos no tecido conjuntivo gengival, rodeados por células polimorfonucleares. Nas amostras que apresentam maior perda de inserção, são visíveis vários sequestros ósseos quer a nível da furca, quer a nível das vertentes gengivais (fig 6). Nalguns casos o sequestro está já fora dos tecidos periodontais e há uma colonização bacteriana muito acentuada (fig 7).



Fig 6 – Sequestro ósseo no sulco gengival. (HE 200x)

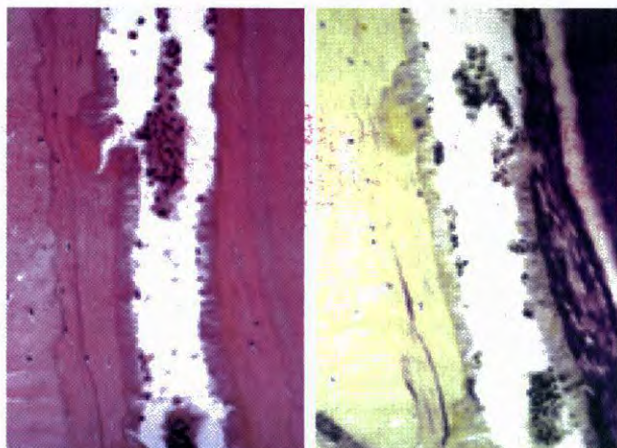


Fig 7 - Placa bacteriana na superfície radicular e superfície óssea de um sequestro, numa bolsa periodontal profunda. (HE e BB, 400x)

No exame macroscópico de duas amostras provenientes de animais distintos, são visíveis lesões exofíticas da mucosa jugal, em relação directa com o nó do fio de sutura. Uma das lesões tem dimensões comparáveis à coroa do molar adjacente (fig 8). No exame histológico, observa-se uma lesão hiperplásica constituída por tecido conjuntivo com grande infiltrado celular e vasos, sem epitélio de recobrimento, localizada na mucosa jugal, sem interferência com os tecidos periodontais (fig 9).



Fig 8 - Lesão exofítica da mucosa jugal, em relação directa com o nó do fio de sutura.

A presença de bactérias nas lesões periodontais é constante, formado aglomerados bacterianos nas superfícies de dentina e cimento radiculares expostos pelo processo patológico. As bactérias estão associadas a uma estrutura de aparência filamentosa, bem organizada, que se destaca da superfície que recobre, osso ou

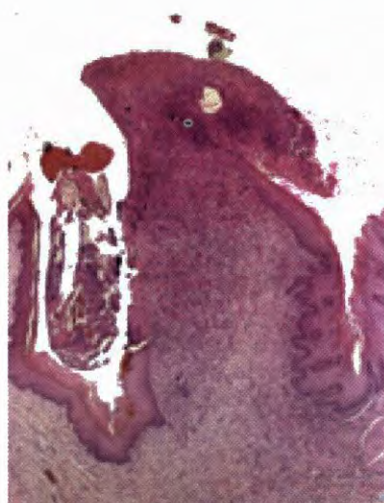


Fig 9 - Lesão hiperplásica constituída por tecido conjuntivo com grande infiltrado celular e vasos, sem epitélio de recobrimento, localizada na mucosa jugal, sem interferência com os tecidos periodontais. (HE 40x)

cimento radicular. Nos casos de grande destruição dos tecidos periodontais, há presença de bactérias em locais muito profundos das lesões. Em algumas das amostras detetam-se bactérias no interior dos túbulos de dentina exposta (fig 10).



Fig 10 - Colónias bacterianas Gram-positivas no interior dos túbulos dentinários da superfície radicular de uma bolsa periodontal. (BB, 400x)

DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliam-se as alterações histológicas decorrentes da colocação de um fio de sutura em torno do colo do 2º molar superior do rato wistar.

As alterações patológicas dos tecidos periodontais foram estudadas em várias espécies de mamíferos, tendo por objectivo o desenvolvimento de modelos animais satisfatórios para investigação. Tais espécies incluem pequenos roedores como murganhos, ratos e hamsters, alguns animais de médio porte como os cães e as ovelhas e alguns primatas não humanos, como o babuíno, o macaco, o chimpanzé e o gorila ⁽¹⁷⁾.

Embora nas diferentes espécies de mamíferos a anatomia dentária e as relações oclusais variem muito, a estrutura e organização dos tecidos periodontais são bastante semelhantes. Como consequência, as características principais da periodontite são comuns a quase todas as espécies de mamíferos, salvaguardadas pequenas excepções.

Antes de iniciar a crítica e discussão de quaisquer resultados experimentais, tem que se ter conhecimentos sobre as características anatómicas e fisiológicas, o tamanho, o crescimento, o tempo de vida e os hábitos da espécie usada como modelo experimental, assim como o tipo de periodontite que lhe é mais comum.

Nos animais mais pequenos, especialmente nos roedores, a dentição é muito diferente da dos humanos, já que a sua fórmula dentária se resume a um incisivo e três molares, por hemi-arcada. A principal diferença na fisiologia reside no facto de os incisivos serem dentes de crescimento contínuo rápido, o que inviabiliza a sua utilização em periodontite experimental. Os molares são igualmente dentes de crescimento contínuo, mas a um ritmo muito lento, tendo semelhanças morfológicas com os molares humanos.

A área dento-gengival nos pequenos roedores é muito similar à área dento-gengival do homem. No entanto, há algumas diferenças que importa sublinhar: o epitélio oral do sulco é queratinizado interferindo na formação das bolsas periodontais ^(5, 10). A distância da junção amelo-cementária à crista óssea aumenta com a idade, mais em lingual e distal do que em vestibular e mesial. Por sua vez, o septo ósseo interdentário e o espaço interdentário supra-alveolar diminuem com a idade. Estas altera-

ções com a idade são devidas ao crescimento das bases ósseas maxilares, à atrição das faces oclusais e à erupção e aposição de cemento e osso serem contínuas. Tais factores têm igualmente implicações no posicionamento tridimensional do dente ^(17, 21).

Os resultados deste estudo demonstram que o protocolo utilizado cria lesões periodontais, associada à presença bacteriana. As lesões com menor tempo de evolução (8 dias) têm características diferentes das lesões criadas ao fim de 15 dias. Podemos descrever a lesão do grupo I como uma "bolsa gengival", com uma perda mínima de inserção periodontal, já que a imagem predominante é a distorção da margem gengival, com aprofundamento do sulco gengival, mas com uma componente mais horizontal. Há um epitélio íntegro queratinizado, que separa o fio e a placa bacteriana a ele aderente dos tecidos gengivais. Há um grande infiltrado inflamatório que parece ser composto essencialmente por neutrófilos, que migram do tecido conjuntivo subepitelial para a bolsa gengival, através do epitélio. O osso alveolar demonstra algumas áreas de reabsorção, mas não muito extensas. Na superfície radicular exposta a placa bacteriana não é muito abundante. Nesta fase, a placa bacteriana é predominantemente Gram-positiva.

Ao fim dos 15 dias, poderemos já falar em bolsas periodontais: o epitélio de recobrimento periodontal está ulcerado, o epitélio juncional migrou apicalmente sobre a superfície radicular, a perda de inserção periodontal é notória, com perda da integridade do ligamento periodontal e reabsorção muito acentuada do osso alveolar. Estas lesões estão associadas à presença de bactérias em zonas muito profundas das bolsas periodontais criadas.

Estes resultados demonstram que, neste modelo de periodontite experimental, a gengivite não é um precursor da periodontite. Neste modelo a criação de defeitos periodontais é bastante rápida (15 dias). Isto está de acordo com outros estudos já efectuados ^(7, 8, 19), em que empregaram o mesmo modelo experimental, embora por vezes com pequenas alterações, como por exemplo a utilização de pequenos

elásticos em vez de fio de sutura ⁽²⁰⁾.

Nos ratos, assim como no homem, a periodontite é um processo infeccioso. A sua caracterização microbiológica ainda não está devidamente estudada. No entanto, os organismos que parecem ser mais frequente são *Enterococcus*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Diphtheroides aeróbicos*, *Staphylococcus* e *Actinobacillus*, com poucos *Bacteroides* e *Fusobacteria* e ausência de espiroquetas. Neste estudo só foi possível detectar a sua presença nas lesões, caracterizá-las quanto ao Gram, não tendo sido possível caracterizar microbiologicamente a placa detectada ⁽¹⁷⁾. Nos estudos que se seguirão será fundamental proceder a tal identificação.

A colocação do fio de sutura em torno do colo do 2º molar revelou ser uma manobra bastante traumática, já que optámos pela utilização de um fio 4/0, cuja agulha é de calibre superior aos espaços interdentários no rato (distância entre JAC é 0,4 mm aos 50 dias e diminui com a idade ⁽¹⁾, e os pontos de contacto têm uma área muito extensa. Para esclarecer as dúvidas surgidas quanto ao papel do traumatismo da passagem da agulha nos espaços interdentários, realizou-se um pequeno estudo colateral, com alguns casos adicionais. Neste estudo, num grupo passou-se toda a agulha pelo espaço, tendo deixado o fio em torno do colo do lado esquerdo, e à direita não. Num outro grupo, utilizou-se a extremidade da agulha como cunha para afastar as superfícies dos dentes contíguos o suficiente para se passar o fio de sutura de coronal para apical e, como no grupo anterior, à esquerda deixou-se o fio no colo dentário e à direita não. Os resultados (não descritos) demonstraram que as lesões criadas derivaram da presença do fio no colo e não do traumatismo causado pela passagem da agulha pelo espaço.

As lesões na mucosa jugal foram diagnosticadas como granulomas piogénicos. Estas lesões parecem estar em relação com a permanência do nó do fio de sutura do lado vestibular dos dentes. Por hipótese, também poderia resultar de lesões criadas durante a colocação do fio, pois a agulha por algumas

vezes criou soluções de continuidade. Mas no estudo colateral, surgiram lesões idênticas no grupo em que a agulha serviu apenas de cunha, sem se ter produzido qualquer lesão da mucosa durante a colocação do fio.

CONCLUSÃO

A presença de um fio de sutura em torno do colo do 2º molar maxilar induziu uma reacção inflamatória aguda nos tecidos periodontais adjacentes. As características mais relevantes das lesões criadas ao fim de oito dias traduzem-se na distorção da margem gengival e numa grande quantidade de células inflamatórias. Passados 15 dias, é nítida a desorganização das fibras gengivais e do ligamento periodontal, a perda de inserção periodontal e a reabsorção do osso alveolar.

O modelo de periodontite experimental no rato Wistar cria defeitos periodontais importantes, por acumulação de placa bacteriana. Mas este modelo, embora aceitável, tem algumas limitações. O tamanho das estruturas dento-alveolares é diminuto, o que cria dificuldades na manipulação experimental. Por outro lado, os defeitos periodontais criados experimentalmente têm uma morfologia um pouco diferente das lesões periodontais nos humanos, e a destruição dos tecidos dá-se muito rapidamente, quando comparada com a evolução da doença periodontal no humano. Histologicamente também encerra algumas limitações: o epitélio oral do sulco é queratinizado o que interfere com a formação das bolsas periodontais. A resposta inflamatória envolve a formação quase exclusiva de um infiltrado inflamatório agudo, com grande preponderância de neutrófilos e a muito diminuta participação de linfócitos e de plasmócitos. Outro tipo de limitações são criadas pelas diferenças nos hábitos, dieta e esperança de vida dos animais.

Este modelo experimental tem sido muito utilizado no estudo de algumas componentes da doença periodontal, particularmente da capacidade de alguns microrganismos patogénicos periodontais causarem lesões periodontais em ratos gnotobióticos ou sem germes monoinfec-

tados^(4, 6, 8, 9, 12, 22). Os modelos experimentais para procedimentos regenerativos que mais têm sido utilizados têm sido o cão Beagle e o Macaca fascicularis⁽³⁾. No entanto têm sido recentemente publicados alguns estudos com a utilização de pequenos roedores como modelos da cicatrização de fenestrações e deiscências⁽¹³⁻¹⁵⁾, e de cirurgia de retalho mucogengival⁽¹¹⁾. Pensamos que este modelo pode ser adaptado para o estudo da regeneração inicial de defeitos periodontais criados experimentalmente.

BIBLIOGRAFIA

1. Amstad-Jossi M, Schroeder HF. Age-related alterations of periodontal structures around the cemento-enamel junction and of the gingival connective tissue composition in germ-free rats. *J Periodontol Res* 1978;13:76-90.
2. Bezerra MM, Lima V, Alencar VB, Vieira IB, Brito GA, Ribeiro RA, Rocha FA. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2000;71:1009-1014.
3. Caton J, Mota L, Gandini L, Laskaris B. Non-human primate models for testing the efficacy and safety of periodontal regeneration procedures. *J Periodontol* 1994;65:1143-1150.
4. Crawford JM, Taubman MA, Smith DJ. The natural history of periodontal bone loss in germ-free and gnotobiotic rats infected with periodontopathic microorganisms. *J Periodont Res* 1978;13:316-325.
5. Eggert FM, Germain JP, Cohen B. The gingival epithelium of rodent molars with limited eruption. *Acta Anat* 1980;107:297-306.
6. Garant PR. Plaque-neutrophil interaction in monoinfected rats as visualized by transmission electron microscopy. *J Periodontol* 1976;47:132-138.
7. Garant PR, Cho MI. Histopathogenesis of spontaneous periodontal disease in conventional rats. I Histometric and histologic study. *J Periodontal Res* 1979;14:297-309.
8. Heijl L, Wennström J, Lindhe J, Socransky SS. Periodontal disease in gnotobiotic rats. *J Periodont Res* 1980;15:405-419.
9. Jordan HV, Keyes PH, Bellack S. Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats infected with *Actinomyces* of human origin. *J Periodontal Res* 1972;7:21-28.
10. Listgarten MA. Similarity of epithelial relationships in the gingiva of rat and man. *J Periodontol* 1975;46:677-680.
11. Kaynak D, Meffert R, Günhan M, Günhan Ö, Özkaya Ö. A histopathological investigation on the effects of the bisphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. *J Periodontol* 2000;71:790-796.
12. Kimura S, Nagai A, Onitsuka T, Koga T, Fujiwara T, Kaya H, Hamada S. Induction of experimental periodontitis in mice with *Porphyromonas gingivalis*-adhered ligatures. *J Periodontol* 2000;71:1167-1173.
13. King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. *J Dent Res* 1997;76:1460-1470.
14. King GN, King N, Hughes FJ. The effect of root surface demineralization on bone morphogenetic protein-2-induced healing of rat periodontal fenestration defects. *J Periodontol* 1998;69:561-570.
15. King GN, Hughes FJ. Effects of occlusal loading on ankylosis, bone, and cementum formation during bone morphogenetic protein-2-stimulated periodontal regeneration in vivo. *J Periodontol* 1999;70:1125-1135.
16. Nociti FH, Nogueira-filho GR, Primo MT, Machado MA, Tramontina VA, Barros SP, Sallum EA. The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. *J Periodontol* 2000;71:1460-1464.
17. Page RC, Schroeder HE. Periodontitis in man and other animals. A comparative review. 1st ed. Zurich: Karger, 1982.
18. Sallay K, Savani F, Ring I, Pham P, Behling UH, Nowotny A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. *J Periodont Res* 1982;17:263-274.

19. Savani F, Listgarten MA, Boyd F, Sallay K, Nowotny A. The colonisation and establishment of invading bacteria in periodontium of ligature-treated immunosuppressed rats. *J Periodontol* 1985; 56:273-280
20. Shoji K, Horiuchi H, Shinoda H. Inhibitory effects of a bisphosphonate (risedronate) on experimental periodontitis in rats. *J Periodont Res* 1995;30:277-284.
21. Vignery A, Baron R. Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodelling in the adult rat. *Anat Rec* 1980;196:191-200.
22. Weinberg MA, Bral M. Laboratory animal models in periodontology. *J Clin Periodontol* 1999;26:335-340.