



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ORAL



**PRISCILLA HAKIME SCALIZE**

**Efeito da membrana de poli(vinilideno-trifluoretileno)/titanato de bário  
no reparo de defeitos ósseos em calvárias de ratas ovariectomizadas**

Ribeirão Preto

2018



**PRISCILLA HAKIME SCALIZE**

**Efeito da membrana de poli(vinilideno-trifluoretileno)/titanato de bário  
no reparo de defeitos ósseos em calvárias de ratas ovariectomizadas**

**Versão Original**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências - Programa: Biologia Oral.

Área de Concentração: Biologia Oral

Orientadora: Profa. Dra. Selma Siéssere

Ribeirão Preto

2018

**Autorizo a reprodução e divulgação do teor total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.**

Catálogo na publicação  
Serviço de Documentação Odontológica  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

### **FICHA CATALOGRÁFICA**

Scalize, Priscilla Hakime

Efeito da membrana de Poli(vinilideno Trifluoretileno)/Titanato de Bário no reparo de defeitos ósseos em calvárias de ratas ovariectomizadas. Ribeirão Preto, 2018.

105p. il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Odontologia.

Orientadora: Siéssere, Selma.

1. Membrana de Poli(Vinilideno-Trifluoretileno)/Titanato de Bário. 2. Osteoporose. 3. Microtomografia. 4. PCR em tempo real.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

SCALIZE, Priscilla Hakime. **Efeito da membrana de Poli(Vinilideno-Trifluoretileno)/Titanato de Bário no reparo de defeitos ósseos em calvárias de ratas ovariectomizadas.** 2018. 105p. Tese (Doutorado em Biologia Oral)-. Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## BANCA EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a)\_\_\_\_\_ Instituição\_\_\_\_\_

Julgamento:\_\_\_\_\_ Assinatura:\_\_\_\_\_



## DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Antonio Rodolpho Scalize** e **Maria Christina Hakime Scalize**, que estão ao meu lado em todos os momentos. Vocês me ensinaram todos os valores que tenho hoje. Não existem palavras que consigam definir o grande amor que sinto por vocês. A minha eterna gratidão é ser a melhor pessoa possível, colocando em prática todas as lições de vida que me deram. Se estou aqui hoje é por causa de vocês!

Ao meu herói que é meu exemplo e cada vez mais admiro, meu irmão **Antonio Rodolpho Hakime Scalize**. Obrigada por sempre cuidar de mim, me aconselhar em todos os momentos e estar sempre por perto mesmo quando, às vezes, a distância física nos separa. A minha nova irmã e cunhada, **Vicky Nogueira Pillegi**, pelo seu carinho e exemplo de dedicação.

Aos meus avós, **Antônio Hakime**, **Orlay B. Hakime**, **Ather Scalize** e **Layde Baitello Scalize**, que em vida me deram carinho e amor, me deixando grandes ensinamentos com suas experiências. Sinto muitas saudades, mas sei que estão sempre perto de mim trazendo luz e paz.

Ao meu namorado **Marco Aurelio Kenichi Yamaji**, por sempre estar ao meu lado e me acompanhar em toda minha trajetória de vida me dando segurança e força. Admiro muito sua luta e determinação.

Aos meus tios **Doutor Adilson Renesto** e **Doutora Maria Angela da Candelária Renesto**, por sempre me apoiarem em minha carreira acadêmica, me encorajando a conquistar novos desafios.

Aos meus tios **Waldemar Bonadio Bertolucci** e **Wilma Bertolucci**, pelo carinho e dedicação que sempre me proporcionam.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **DEUS**, pois foi quem me deu a vida e capacidade para alcançar meus objetivos. Agradeço pela minha saúde, pela família que me deu e por permitir que eu realize mais este sonho.

Só estou aqui hoje pelas mãos de uma pessoa muito especial que é minha orientadora, **Professora Doutora Selma Siéssere**, que está comigo em toda minha jornada. Tive o prazer e a sorte de tê-la ao meu lado e juntas realizar mais um sonho. Obrigada por me deixar participar de sua vida acadêmica e por me proporcionar todo o seu afeto e dedicação, sempre preocupada comigo me dando conselhos e carinho, além de me dar o prazer de aprender cada vez mais como aluna. Admiro o seu trabalho e posso crescer cada vez mais como pessoa, seguindo seus exemplos de dedicação e amor.

Aos Professores Doutores **Marisa Semprini, Simone Cecílio Hallak Regalo, Karina Fittipaldi Bombonato Prado**, obrigada por sempre me acompanharem e me darem suporte em todos os momentos em que precisei, sabendo que podia sempre contar com a ajuda e dedicação de vocês.

Ao **Prof. Dr. Rossano Gimenes** da Universidade Federal de Itajubá que confeccionou e cedeu material para minha pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Antônio Augusto Coppi**, pela disponibilidade em me receber em seu laboratório, me passando um pouco de seu conhecimento para meu crescimento nas pesquisas.

Aos Especialistas de Laboratório, **Luiz Gustavo de Sousa, Paulo Batista de Vasconcelos e Fabíola Singaretti de Oliveira** aos Técnicos de Laboratório **Adriana L. G. de Almeida, Milla Sprone Tavares, Roger Rodrigo Fernandes, Sebastião Carlos Bianco, Dimítrius Leonardo Pitol** e Auxiliar de Laboratório **Túlio R. V. de Paula Lopes**, obrigada por me ajudarem durante minha pesquisa, pelos momentos de descontração, pelos conselhos e pela força que sempre recebi, podendo confiar sempre em vocês e aprender cada vez mais para meu crescimento profissional.

Aos funcionários do Biotério **Antonio Massaro** e **Aline Aparecida Ferraresi Tiballi**, por se dedicarem aos animais de minha pesquisa cuidando deles com carinho.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, representada pela sua Diretora **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva** por proporcionar a realização de mais um sonho, que é o programa de doutorado.

Ao Coordenador do Programa Biologia Oral, **Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti**, por sempre me apoiar e proporcionar a realização deste trabalho.

Aos Professores do Programa Biologia Oral, com os quais tive o prazer de aprender e aprimorar meus conhecimentos.

À funcionária da seção de Pós-Graduação, **Mary Possani Carmessano**, pela ajuda nas questões administrativas.

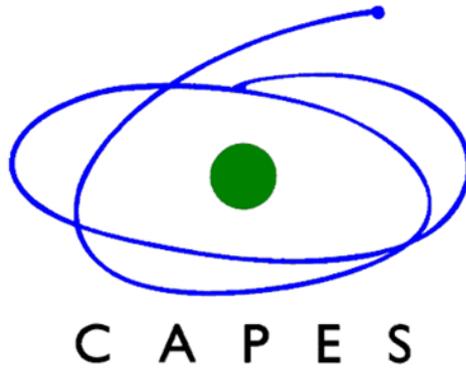
À secretária do departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica, **Clélia Aparecida Celino** e à secretária do Programa Biologia Oral **Imaculada Jainaira Miguel**, por sempre estarem por perto me ajudando e me dando forças para que eu pudesse atingir meus objetivos.

Aos **Amigos e Colegas do Programa de Doutorado**, que sempre estão presentes ajudando no que for necessário, podendo sempre contar com vocês.

À minha amiga **Camila Barreto** que sempre esteve ao meu lado, me dando apoio e força em todos os momentos da minha carreira e de vida.

Agradeço a **todos** que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

**À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**



**À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**



**Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**





## RESUMO

SCALIZE, Priscilla Hakime. **Efeito da membrana de Poli (Vinilideno-Trifluoretileno)/Titanato de Bário no reparo de defeitos ósseos em calvárias de ratas ovariectomizadas.** 2018. 105p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O aumento da longevidade da população mundial vem acompanhado do aumento da incidência de doenças crônicas. Várias são as doenças que podem acometer esta população e entre estas, a osteoporose, que compromete a resistência e qualidade do tecido ósseo, predispondo a fraturas. Além disso, a osteoporose pode dificultar a reparação óssea. Uma técnica importante e que tem por objetivo a neoformação óssea é a regeneração óssea guiada (ROG), que utiliza uma membrana que atua como uma barreira mecânica, permitindo a criação de um espaço protegido em torno do defeito ósseo. Embora a membrana de politetrafluoretileno (PTFE) seja uma das mais utilizadas na ROG, novas membranas têm sido desenvolvidas dentre elas a membrana obtida pela associação do polímero de poli(vinilideno-trifluoretileno) e da cerâmica de titanato de bário (P(VDF-TrFE)/BT). Estudos *in vitro* demonstraram resultados favoráveis à membrana de P(VDF-TrFE)/BT. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vivo*, o efeito da membrana de poli(vinilideno-trifluoretileno)/titanato de bário (P(VDF-TrFE)/BT), e como controle a de PTFE no reparo ósseo em ratas com modelo experimental para a osteoporose. Foram utilizados 30 animais, sendo 5 pertencentes ao grupo controle - Grupo 1 (G1) e 25 que foram ovariectomizados bilateralmente (OVX). Após 150 dias foram confeccionados defeitos ósseos (5 mm) na calvária e os animais OVX foram distribuídos em três grupos com relação à utilização ou não de membranas nos defeitos ósseos: Grupo 2 - nenhum tipo de membrana; Grupo 3 - membrana de PTFE e Grupo 4 - membrana de P(VDF-TrFE)/BT. Após 4 semanas, os animais foram eutanasiados e as calvárias foram coletadas para as análises histológica, histomorfométrica por micro-CT e de expressão gênica por PCR em tempo real. A análise histomorfométrica mostrou que os animais que receberam a membrana de P(VDF-TrFE)/BT apresentaram parâmetros morfométricos semelhantes ou até melhores quando comparados com os animais que receberam a membrana de PTFE. A comparação dos grupos que receberam as membranas mostrou para o grupo P(VDF-TrFE)/BT uma menor expressão para os genes RUNX2, BSP, OPN, OSX e RANKL; uma expressão semelhante para os genes ALP, OC, RANK e CTSK e uma maior expressão dos genes OPG, CALCR e MMP9. Estes resultados evidenciam que a membrana de P(VDF-TrFE)/BT pode ser considerada um biomaterial promissor para a reparação óssea em condições de osteoporose.

**Palavras-Chave:** Membrana de Poli(Vinilideno-Trifluoretileno)/Titanato de Bário. Osteoporose. Microtomografia. PCR em tempo real.



## ABSTRACT

SCALIZE, Priscilla Hakime. **Effect of Poly (Vinylidene-Trifluoroethylene) / Barium Titanate membrane on the repair of bone defects in calvaria of ovariectomized rats.** 2018. 105p. Thesis (Doctorate in Science) - School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The worldwide population age is increasing accomplished by chronic disease. The most common disease which involves the population is the osteoporosis. The bone resistance and quality of bone matrix are compromised and the fractures risks are higher. Nonetheless, the osteoporosis can avoid the bone healing. The important technique to achieve the bone neoformation is the Bone Guided Regeneration (BGR), which used a membrane as mechanic barrier to allow the new gap protection around the bone defect. Although the polytetrafluoroethylene (PTFE) is the most used in BGR, newest membranes have been developed as the polyvinylidene-trifluoroethylene polymer and barium titanate ceramics (P(VDF-TrFE)/BT). In vitro assays showed favorable results to P(VDF-TrFE)/BT membrane. The aim of the study was to evaluate the poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene)/barium titanate (P(VDF-TrFE)/BT) effects, and the PTFE has been used as control on the bone repair in the osteoporosis experimental rats model. It was used 30 animals, 5 on the control group- Group 1 (G1) and 25 were ovariectomized bilaterally (OVX). Bone gaps were done 5mm size on the rats calvaria's and the (OVX) were housed in three different groups concerned by membranes applied or not at the bone gap. Group 2 – no membrane applied; Group 3 PTFE membrane and Group 4 P(VDF-TrFE)/BT membrane. Four weeks later, the animals were euthanized and the calvarias were collected to the histological analysis, histomorphometric assays by micro – CT and the gene expression by the real time PCR. The histomorphometric analysis showed that the animals which received P(VDF-TrFE)/BT membrane presented similar morphometric parameters better than PTFE. The P(VDF-TrFE)/BT showed a minor expression to RUNX2, BSP, OPN, OSX e RANKL genes; the similar were to RANK e CTSK and the higher expression were to OPG, CALCR e MMP9. These results evidence that the P(VDF-TrFE)/BT could be used as promising biomaterial to bone healing under osteoporosis.

**Keywords:** Poly (Vinylidene-Trifluoroethylene) Membrane / Barium Titanate. Osteoporosis. Microtomography. Real-time PCR.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Em a: exposição dos ovários (seta) e em b: ovário completamente excisionado (seta).....	42
<b>Figura 2 -</b>	Coleta do fluido vaginal.....	43
<b>Figura 3 -</b>	Fotomicrografia de fluido vaginal não corado. Em a: rata ovariectomizada na fase diestro, com predominância de leucócitos e em b: rata controle na fase proestro com predominância de células epiteliais nucleadas.....	44
<b>Figura 4 -</b>	Em a: cornos uterinos de aspecto normal (seta) em rata do grupo controle (não ovariectomizada) e em b: cornos uterinos atrofiados (seta) confirmando o sucesso da ovariectomia.....	45
<b>Figura 5 -</b>	Em a: defeito ósseo confeccionado no osso parietal esquerdo e em b: membrana de titanato de bário inserida e adaptada no defeito ósseo.....	46
<b>Figura 6 -</b>	Amostra de tecido ósseo contendo a área cicatricial com a membrana e tecido ósseo remanescente adjacente (margem de segurança).....	47
<b>Figura 7 -</b>	Fotomicrografia do defeito ósseo em animal do grupo controle que não recebeu membrana. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado e TC: tecido conjuntivo.....	58
<b>Figura 8 -</b>	Fotomicrografia do defeito ósseo em animal do grupo controle que não recebeu membrana. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado e TC: tecido conjuntivo.....	58
<b>Figura 9 -</b>	Fotomicrografia do defeito ósseo em animal do grupo ovariectomizado que não recebeu membrana. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado e TC: tecido conjuntivo.....	59
<b>Figura 10 -</b>	Fotomicrografia do defeito ósseo em animal do grupo ovariectomizado que não recebeu membrana. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado e TC: tecido conjuntivo.....	59
<b>Figura 11 -</b>	Fotomicrografia do defeito ósseo em animal ovariectomizado que recebeu a membrana de PTFE. OR: osso remanescente e ON: osso neoformado.....	60
<b>Figura 12 -</b>	Fotomicrografia do defeito ósseo em animal ovariectomizado que recebeu a membrana de PTFE. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado e TCM: tecido conjuntivo medular.....	60
<b>Figura 13 -</b>	Fotomicrografia do defeito ósseo em animal ovariectomizado que recebeu a membrana de PVDF (TB - titanato de bário). OR: osso remanescente e ON: osso neoformado.....	61

<b>Figura 14 -</b>	Fotomicrografia do defeito ósseo em animal ovariectomizado que recebeu a membrana de PVDF. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado, TC: tecido conjuntivo e VS: vaso sanguíneo.....	61
<b>Figura 15 -</b>	Imagem tridimensional (superior e póstero-superior) dos defeitos ósseos nos diferentes grupos. Em A: Controle; B: Ovariectomizado; C: Membrana de PTFE e D: Membrana de PVDF. Observa-se a pequena formação óssea em A e B (defeitos ósseos que não receberam membrana) e a maior formação óssea em C e D.....	63
<b>Figura 16 -</b>	Volume ósseo ( $\text{mm}^3$ ) nos Grupos Controle, Ovariectomizado (OVX), PTFE e PVDF. * Indica diferença estatística significativa.....	64
<b>Figura 17 -</b>	Superfície óssea ( $\text{mm}^2$ ) nos Grupos Controle, Ovariectomizado (OVX), que recebeu a membrana de PTFE e que recebeu a membrana PVDF. * Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).....	65
<b>Figura 18 -</b>	Superfície óssea específica ( $\text{mm}^2/\text{mm}^3$ ) nos Grupos Controle, Ovariectomizado (OVX), que recebeu a membrana de PTFE e que recebeu a membrana PVDF. * Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).....	66
<b>Figura 19 -</b>	Número de trabéculas (1/mm) nos Grupos Controle, Ovariectomizado (OVX), que recebeu a membrana de PTFE e que recebeu a membrana PVDF. * Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).....	67
<b>Figura 20 -</b>	Espessura trabecular (mm) nos Grupos Controle, Ovariectomizado (OVX), que recebeu a membrana de PTFE e que recebeu a membrana PVDF.....	68
<b>Figura 21 -</b>	Separação trabecular (mm) nos Grupos Controle, Ovariectomizado (OVX), que recebeu a membrana de PTFE e que recebeu a membrana PVDF. * Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).....	68
<b>Figura 22 -</b>	Densidade de conectividade ( $1/\text{mm}^3$ ) nos Grupos Controle, Ovariectomizado (OVX), que recebeu a membrana de PTFE e que recebeu a membrana PVDF. * Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).....	69
<b>Figura 23 -</b>	Ensaio de integridade do RNA ribossômico. Amostras 1-4 (PTFE); amostras 5-8 (PVDF).....	70
<b>Figura 24 -</b>	Eletoferograma do gel de integridade do RNA ribossômico. Presença dos picos referentes as bandas 18S e 28S. Amostras 1-4 (PTFE); amostras 5-8 (PVDF).....	71
<b>Figura 25 -</b>	Expressão relativa de RUNX2 em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. * Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).....	72

<b>Figura 26 -</b>	Expressão relativa de BSP em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média ± desvio padrão. * Indica diferença estatística significativa (p<0,05).....	72
<b>Figura 27 -</b>	Expressão relativa de OPN em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média ± desvio padrão. * Indica diferença estatística significativa (p<0,05).....	73
<b>Figura 28 -</b>	Expressão relativa de OSX em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média ± desvio padrão. * Indica diferença estatística significativa (p<0,05).....	73
<b>Figura 29 -</b>	Expressão relativa de RANKL em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média ± desvio padrão. * Indica diferença estatística significativa (p<0,05).....	73
<b>Figura 30 -</b>	Expressão relativa de ALP em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média ± desvio padrão.....	74
<b>Figura 31 -</b>	Expressão relativa de OC em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média ± desvio padrão.....	74
<b>Figura 32 -</b>	Expressão relativa de OPG em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média ± desvio padrão. * Indica diferença estatística significativa (p<0,05).....	75
<b>Figura 33 -</b>	Expressão relativa de RANK em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média ± desvio padrão.....	75

- Figura 34 -** Expressão relativa de CTSK em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão..... 76
- Figura 35 -** Expressão relativa de MMP-9 em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \* Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ )..... 76
- Figura 36 -** Expressão relativa de CALCR em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \* Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ )..... 77
- Figura 37 -** Expressão relativa da razão entre RANKL e OPG em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \* Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ )..... 77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Sondas TaqMan utilizadas nos ensaios de PCR em tempo real.....	52
<b>Tabela 2-</b>	Significância ( <i>p</i> ) entre os grupos analisados para o parâmetro volume ósseo. Teste de Holm-Sidak ( $p<0,05$ ).....	64
<b>Tabela 3 -</b>	Significância ( <i>p</i> ) entre os grupos analisados para o parâmetro superfície óssea. Teste de Holm-Sidak ( $p<0,05$ ).....	65
<b>Tabela 4 -</b>	Significância ( <i>p</i> ) entre os grupos analisados para o parâmetro superfície óssea específica. Teste de Holm-Sidak ( $p<0,05$ ).....	66
<b>Tabela 5 -</b>	Significância ( <i>p</i> ) entre os grupos analisados para o parâmetro número de trabéculas. Teste de Holm-Sidak ( $p<0,05$ ).....	67
<b>Tabela 6 -</b>	Significância ( <i>p</i> ) entre os grupos analisados para o parâmetro separação trabecular. Teste de Holm-Sidak ( $p<0,05$ ).....	68
<b>Tabela 7 -</b>	Significância ( <i>p</i> ) entre os grupos analisados para o parâmetro densidade de conectividade. Teste de Holm-Sidak ( $p<0,05$ ).....	69



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ALP</b>	Fosfatase Alcalina
<b>AVTRW</b>	AVTRW Association for Veterinary Teaching and Research Work
<b>BSP</b>	Sialoproteína óssea
<b>C</b>	Controle
<b>CALCR</b>	Calcitonina
<b>CAPES</b>	Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CNPQ</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>Ct</b>	Ciclo treshold
<b>CTSK</b>	Catepsina K
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EUA</b>	Estados Unidos
<b>FAPESP</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
<b>FORP</b>	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
<b>G</b>	Grupo
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído -3- Fosfato Desidrogenase
<b>MG</b>	Minas Gerais
<b>Micro - CT</b>	Análise Tomográfica
<b>min</b>	Minuto
<b>MMP – 9</b>	Metaloproteinase - 9 da Matriz
<b>n</b>	Número
<b>OC</b>	Osteocalcina
<b>ON</b>	Osso Neoformado
<b>OPG</b>	Osteoprotegerina
<b>OPN</b>	Osteopontina
<b>OR</b>	Osso Remanescente
<b>OSX</b>	Osterix
<b>OVX</b>	Ovariectomizada
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PR</b>	Paraná
<b>PTFE</b>	Politetrafluoretileno
<b>PVDF</b>	Fluoreto de polivinilideno
<b>(P(VDF- TrFE/BT)</b>	Polímero de Poli(Vinilideno-Trifluoretileno) e Cerâmica de Titanato de Bário
<b>RANK</b>	Receptor para Ativação do Fator Nuclear Kappa-B

<b>RANKL</b>	Ligante do Receptor para Ativação do Fator Nuclear Kappa-B
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensageiro
<b>ROG</b>	Regeneração Óssea Guiada
<b>rpm</b>	Rotações por Minuto
<b>RANX -2</b>	Fator de transcrição 2 com domínio Runt
<b>SBPqO</b>	Sociedade Brasileira De Pesquisa Odontológica
<b>SP</b>	São Paulo
<b>TB</b>	Titanato de bário
<b>TC</b>	Tecido Conjuntivo
<b>TCM</b>	Tecido Conjuntivo Medular
<b>USA</b>	United States
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo
<b>VS</b>	Vaso Sanguíneo
<b>2D</b>	2 dimensões
<b>3D</b>	3 dimensões

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
cm	Centímetro
g	grama
<b>Kg</b>	kilograma
mm	Milímetros
mg	Miligramma
ml	Milímetro
n°	Número
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
<i>p</i>	Significância
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
®	Marca Registrada
s	Segundos
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
µL	Microlitros
%	Porcentagem
*	Diferença Estatística
<b>p</b>	Página
<	Maior
=	Igual



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>2. PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
3.1 Aquisição da membranas.....	31
3.2 Animais - ratas wistar.....	41
3.3 Cirurgia de ovariectomia bilateral.....	41
3.4 Grupo controle - Sham.....	42
3.5 Exame do ciclo estral dos cornos uterinos.....	43
3.6 Criação do defeito ósseo.....	45
3.7 Eutanásia dos animais.....	47
3.8 Análise tomográfica.....	48
3.9 Processamento histológico.....	48
3.10 Extração do RNA total.....	49
3.11 Avaliação da integridade do RNA total.....	50
3.12 Síntese da fita de DNA complementar.....	51
3.13 Expressão de genes envolvidos na diferenciação osteoblástica e osteoclástica por PCR em tempo real.....	51
3.14 Análise estatística.....	53
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
4.1 Análise Histológica.....	57
4.2 Resultados da Análise Tomográfica.....	62
4.3 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real.....	70
4.3.1 Integridade do RNA.....	70
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>97</b>



# ***1. INTRODUÇÃO***

---



## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o aumento da expectativa de vida tem promovido alterações no perfil demográfico da população mundial. De acordo com as Projeções das Nações Unidas (Fundo de Populações), em 2050, pela primeira vez, haverá mais idosos que crianças menores de 15 anos, com uma estimativa de 2 bilhões de pessoas idosas, constituindo desta forma 22% da população global (NAÇÕES UNIDAS – UNFPA, 2012).

O mesmo está acontecendo no Brasil, que vem apresentando um novo padrão demográfico, que se caracteriza pela redução da taxa de crescimento populacional e por transformações profundas na composição de sua estrutura etária, com um significativo aumento do contingente de idosos. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística estimam que o Brasil apresenta uma população idosa de aproximadamente 23,5 milhões de pessoas. Estas mudanças no perfil epidemiológico da população têm acarretado importantes mudanças nos indicadores de morbimortalidade (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2018). No cenário brasileiro é importante destacar a feminilização da velhice, com uma estimativa para o ano de 2020 de 66,2% de idosos do gênero feminino contra 33,8% do gênero masculino, com 80 anos ou mais (SECRETARIA DE DIREITOS HUMANOS, 2018).

O aumento desta população vem acompanhado do aumento das doenças crônicas, dentre elas a osteoporose. Desta maneira, pesquisas vem sendo realizadas para que esta população em especial tenha maior qualidade de vida (AMADEI et al., 2006) tendo em vista que, ao terem vidas mais saudáveis, maiores serão as oportunidades e menores serão os custos para os idosos, famílias e sociedade (NAÇÕES UNIDAS – UNFPA, 2012).

A osteoporose ocasiona a perda de massa óssea afetando a estrutura do osso, tornando-o frágil e em consequência acarretando a fraturas (GALI, 2001). Existem fraturas que não são percebidas pelo indivíduo e outras que podem levar a dores ou problemas crônicos mais sérios afetando a qualidade de vida e podendo levar à morte (DE SOUZA, 2010).

Certas pessoas são mais propensas a desenvolver osteoporose do que outras. Vários são os fatores de risco para esta doença e sobre alguns fatores não existe controle, enquanto que outros, podem ser mudados. Idade, gênero, menopausa, histórico familiar e baixo peso corporal são exemplos de fatores de risco que não podem ser controlados. A falta de uma dieta balanceada com frutas, verduras e legumes, dietas extremamente ricas em proteínas, sódio e cafeína, sedentarismo, tabagismo, consumo excessivo de álcool e perda de peso são

fatores de risco que podem ser alterados. Desordens autoimunes, digestivas e gastrointestinais, endócrinas, hematológicas e neurológicas também podem desencadear osteoporose (NATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION, 2013).

A osteoporose pode ser classificada em primária (tipo I e tipo II) e secundária. A osteoporose primária do tipo I ocorre após a menopausa, entre 55 e 75 anos, e caracteriza-se pela perda acelerada de osso trabecular devido à deficiência de hormônios estrogênicos. A osteoporose primária do tipo II ou senil relaciona-se com o envelhecimento e a osteoporose secundária é decorrente de processos inflamatórios (RIGGS; MELTON, 1983; GALI, 2001; PINTO-NETO et al., 2002).

A osteoporose tem trazido grande preocupação aos profissionais da área odontológica, tendo em vista que esta doença relaciona-se com a perda óssea; aumento do risco de doença periodontal (TEZAL et al., 2000; VISHWANATH et al., 2011; PENONI et al., 2017) e interfere no reparo de defeitos ósseos críticos. Estudos demonstraram que indivíduos com osteoporose apresentam maior perda dental e maior reabsorção do processo alveolar, acarretando a atrofia deste processo e diminuição em altura da crista óssea (DANIELL, 1983; DEVLIN; FERGUSON, 1991; MOHAMMAD; BRUNSVOLD; BAUER, 1996; TEZAL et al., 2000; GUR et al., 2003; YOSHIHARA et al., 2005; DROZDZOWSKA; PLUSKIEWIAZ; MICHNO, 2006; ERDOGAN et al., 2009; MOEDANO et al., 2011).

Uma das técnicas utilizadas para a reparação óssea na área da periodontia é a regeneração óssea guiada (ROG). Esta técnica tem sido utilizada em cirurgias reconstrutivas experimentais desde meados de 1950, para fusão espinhal (HURLEY et al., 1959) e em cirurgias de reconstruções maxilo faciais (BOYNE, 1964; BOYNE, 1969).

Na técnica de regeneração óssea guiada insere-se uma membrana e a mesma atua como uma barreira mecânica, criando um espaço protegido em torno do defeito ósseo. O coágulo sanguíneo preenche o espaço permitindo que as células osteogênicas colonizem a área, sem competição com as células do tecido mole que envolvem o defeito (RONDA et al., 2014).

Para que estas membranas possam ser utilizadas na ROG, devem possuir algumas características básicas como: 1- biocompatibilidade (não provocar uma resposta imune, sensibilização ou inflamação crônica que possa interferir com a cura e apresentar perigo para o paciente); 2 - oclusividade (atuar como uma barreira para excluir tipos de células indesejáveis de entrar no espaço isolado); 3- serem capazes de manter os espaços adjacentes permitindo o crescimento ósseo; 4 - serem capazes de se integrarem aos tecidos adjacentes,

evitando o rápido crescimento epitelial na superfície externa do material e proporcionar estabilidade ao retalho sobreposto; 5 - facilidade de manuseio (ser de fácil aplicação e inserção) (SAM; PILLAI, 2014). É importante ressaltar que aliada a todas estas características, a estabilidade mecânica tem um papel fundamental na formação óssea. Se movimentações microscópicas ocorrem entre osso e qualquer material implantado a formação óssea é prejudicada, resultando no desenvolvimento de tecido fibroso (DUCHEYNE; MEESTER; AERNOUDT, 1977; HECK et al., 1986). A rede de vasos neoformados, que é um pré-requisito para a formação óssea, é altamente sensível às condições mecânicas, desta forma, quanto menos carga a região receber, maior será a formação óssea e maior a remodelação vascular, aumentando o número de grandes vasos e diminuindo o número e pequenos vasos (BOERCKEL et al., 2011).

Dois tipos de membranas podem ser utilizadas na regeneração óssea guiada, as absorvíveis e as não-absorvíveis, e ambas, com a correta aplicação da técnica, apresentam resultados satisfatórios (E SILVA et al., 2005).

São exemplos de membranas absorvíveis aquelas constituídas por colágeno, quitosana, híbridas de colágeno-quitosana, polímeros de ácidos polilácticos e polímeros de poligalactina. Como exemplo de membrana não-absorvível temos as de politetrafluoretileno (PTFE) expandido, politetrafluoretileno reforçadas com titânio e politetrafluoretileno denso (DIMITRIOU et al., 2012). O PTFE é um polímero com cadeia molecular constituída de ligações carbono-carbono e carbono-flúor. As membranas constituídas por este polímero são biocompatíveis e mantêm a sua integridade estrutural durante o processo de implantação. Possuem propriedades superiores de manutenção de espaço e de oclusividade quando comparadas às membranas absorvíveis (WILTFANG; MERTEN; PETERS, 1998). A membrana de politetrafluoretileno é considerada padrão ouro na técnica de regeneração óssea guiada (RONDA et al., 2014) porém, na busca da reparação óssea, é imprescindível o desenvolvimento de novos biomateriais.

Embora membranas absorvíveis e não-absorvíveis tenham sido desenvolvidas e amplamente investigadas, pesquisas tentam desenvolver a membrana ideal para aplicação clínica (DIMITRIOU et al., 2012; RAKHMATIA et al., 2013). Nesse sentido foi desenvolvida a membrana constituída pelo compósito de polímero de poli(vinilideno-trifluoretileno) e pela cerâmica de titanato de bário (P(VDF-TrFE)/BT) que associa as características mecânicas dos polímeros com a biocompatibilidade das cerâmicas (GIMENES et al., 2004).

Estudos prévios *in vitro* mostraram que as expressões fenotípicas de osteoblastos, fibroblastos do ligamento periodontal e queratinócitos são maiores nas culturas crescidas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT quando comparada à membrana de PTFE, podendo ser uma alternativa vantajosa para uso em procedimentos que necessitem de regeneração óssea (BELOTI et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2011). Além disso, estudos *in vivo* utilizando as membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT em animais saudáveis também mostraram melhores resultados quando utilizada a membrana de P(VDF-TrFE)/BT.

Tendo em vista os resultados anteriores obtidos nos estudos *in vitro* e *in vivo*, nossa hipótese é que a membrana de P(VDF-TrFE)/BT também possa favorecer a formação de tecido ósseo em ratas submetidas a um modelo experimental de osteoporose, onde a perda óssea pode ser uma interferência no reparo de defeitos críticos.

## ***2. PROPOSIÇÃO***

---



## **2. PROPOSIÇÃO**

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a neoformação óssea, em defeitos na calvária de ratas ovariectomizadas, na presença da membrana de P(VDF-TrFE)/BT por meio de análise histológica, tomográfica e molecular.



### ***3. MATERIAL E MÉTODOS***

---



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AQUISIÇÃO DAS MEMBRANAS

Membranas de P(VDF-TrFE)/BT foram preparadas pelo pesquisador Rossano Gimenes conforme descrito previamente por Gimenes et al. (2004) e membranas de PTFE disponíveis comercialmente (Bionnovation®, Bauru, São Paulo, Brasil) foram utilizadas como controle. Todas as membranas foram cortadas na forma de discos com 5 mm de diâmetro e esterilizadas por autoclave antes de serem utilizadas nos experimentos *in vivo*.

#### 3.2 ANIMAIS – RATAS WISTAR

Ratas Wistar (n=30) com peso aproximado de 300g foram obtidas no Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto. Estas foram mantidas em número de três animais por caixa, com temperatura ambiente controlada entre máxima de 24°C e mínima de 23°C e com timer programado para doze horas de iluminação diária. Os animais receberam ração e água “ad libitum”. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo nº 2014.1.157.58.4).

#### 3.3 CIRURGIA DE OVARIECTOMIA BILATERAL

Após a primeira semana foi realizada a primeira cirurgia em 25 animais. Os animais foram pesados e anestesiados com a solução anestésica de xilazina (Hertape Calier - Juatuba, MG, Brasil) e cloridrato de cetamina - anestésico geral, fornecido pela União Química Farmacêutica Nacional S/A (Embu-Guaçu, SP, Brasil), na proporção de 75mg/Kg de cloridrato de cetamina e de 10mg/Kg de xilazina, injetada por via intraperitoneal.

Após anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia bilateral e em seguida, foi feita a antisepsia dos locais com álcool iodado. Foram aplicadas gazes esterilizadas embebidas em soro fisiológico a 0,9% em ambos os olhos dos animais, com o objetivo de prevenir o ressecamento das córneas.

Incisões cutâneas foram realizadas bilateralmente e por meio da divulsão do tecido muscular foi feita a exposição dos ovários e excisão dos mesmos (KALU, 1991) como pode ser visto na figura 1. Os tecidos foram suturados com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) fechando devidamente as margens do retalho. Em seguida, cada animal recebeu, via intramuscular, uma única dose de analgésico Flunixinina meglumina (10 mg/100g peso corporal) (Banamine, Schering-Plough, Brasil) e de uma

solução de antibióticos contendo: Benzilpenicilina benzatina (156.000 UI/100g peso corporal), Benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100g peso corporal), Benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100g peso corporal), Diidroestreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) e Estreptomicina base (sulfato) (65 mg/100g peso corporal) (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge<sup>®</sup>, Campinas, SP, Brasil). Os animais foram mantidos em número de três por caixa, por cento e cinquenta dias (RAWLISON et al., 2009) e receberam ração e água “ad libitum”. Os mesmos ficaram sob constante observação, sendo feita a limpeza de suas caixas, com troca da maravalha, três vezes por semana.

**Figura 1-** Em a: exposição dos ovários (seta) e em b: ovário completamente excisionado (seta)



### 3.4 GRUPO CONTROLE – SHAM

Os animais do grupo controle (n=5) foram pesados, anestesiados e incisionados para a exposição e posterior reintrodução dos ovários, e suturados a fim de serem submetidos ao mesmo estresse sofrido pelos animais ovariectomizados.

Estes animais também receberam, via intramuscular, uma única dose de analgésico Flunixinina meglumina (10 mg/100g peso corporal) (MSD Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil) e de uma solução de antibióticos contendo: Benzilpenicilina benzatina (156.000 UI/100 g peso corporal), Benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100g peso corporal), Benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100g peso corporal), Diidroestreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) e Estreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge<sup>®</sup>, Campinas, SP, Brasil). Os animais foram mantidos em número de três por caixa, por cento e cinquenta dias e receberam ração e água “ad libitum”.

### 3.5 EXAME DO CICLO ESTRAL E EXAME MACROSCÓPICO DOS CORNOS UTERINOS

Duas semanas após a cirurgia, os animais foram submetidos ao exame do ciclo estral, por meio da coleta de fluido vaginal, sempre pelo início da manhã, por um período de 5 dias consecutivos (Figura 2). Por meio de uma pequena ponteira acoplada em uma micropipeta, foi introduzida aproximadamente 1mL de solução salina no interior da vagina da rata. Após a introdução, a solução foi rapidamente aspirada e seu conteúdo transferido para uma lâmina de vidro e imediatamente observado em microscopia óptica (HOAR; HICKMAN, 1975; MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

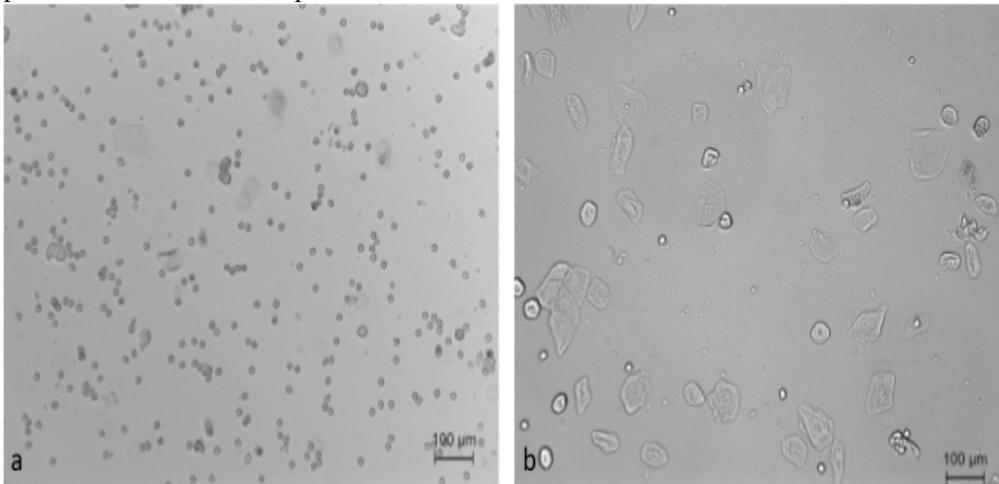
**Figura 2-** Coleta do fluido vaginal



Esta técnica permite investigar as alterações ocorridas no ciclo reprodutivo. O ciclo estral das ratas dura de 4 a 5 dias e o mesmo pode ser dividido nas fases metaestro, diestro, proestro e estro. Cada uma das fases se caracteriza por apresentar o predomínio de determinado hormônio sexual bem como um tipo de célula predominante que pode ser facilmente observado nos esfregaços da vagina. Na fase metaestro, na qual há o início do aumento da secreção de hormônios estrogênicos e o primeiro pico de progesterona, observam-se leucócitos predominantemente e algumas células epiteliais anucleadas. A fase diestro é marcada pelo final do primeiro pico de progesterona e baixos níveis de hormônios estrogênicos e há basicamente o predomínio de leucócitos e algumas células epiteliais

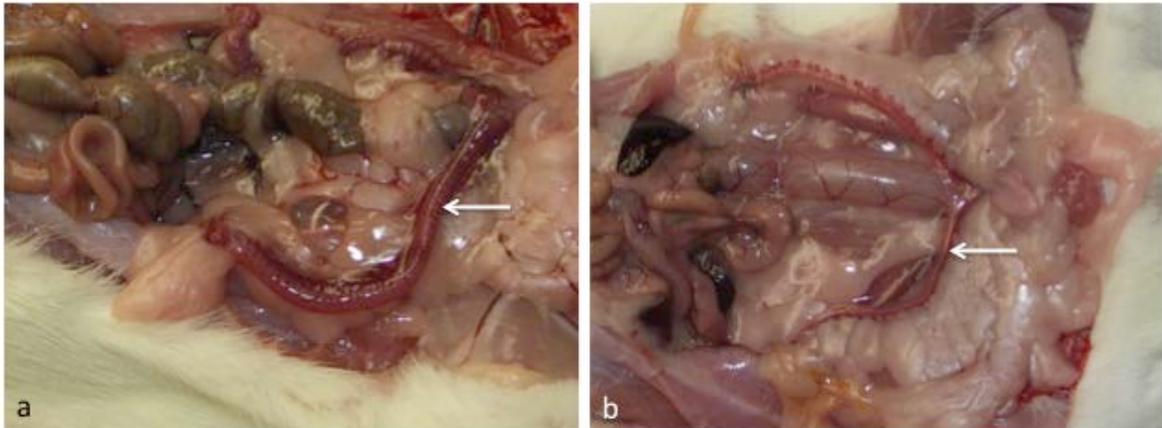
nucleadas. Na fase proestro ocorre o pico de secreção de hormônios estrogênicos e o segundo pico de progesterona, desaparecendo quase que totalmente os leucócitos e aumentando o número de células epiteliais nucleadas. Na fase estro os níveis de hormônios estrogênicos retornam aos valores basais e predominam basicamente células epiteliais queratinizadas da camada córnea (Figura 3) (HOAR; HICKMAN, 1975; MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

**Figura 3-** Fotomicrografia de fluido vaginal não corado. Em a: rata ovariectomizada na fase diestro, com predominância de leucócitos e em b: rata controle na fase proestro com predominância de células epiteliais nucleadas



O efeito da ovariectomia bilateral também foi avaliado por meio do exame macroscópico dos cornos uterinos, durante a eutanásia dos animais, após a incisão da região abdominal para localização das respectivas estruturas. Nos animais ovariectomizados (com deficiência de hormônios) os cornos uterinos apresentaram-se finos, atróficos e anêmicos e nos animais não ovariectomizados eles apresentaram-se róseos e volumosos (Figura 4).

**Figura 4-** Em a: cornos uterinos de aspecto normal (seta) em rata do grupo controle (não ovariectomizada) e em b: cornos uterinos atrofiados (seta) confirmando o sucesso da ovariectomia



### 3.6 CRIAÇÃO DO DEFEITO ÓSSEO

Após cento e cinquenta dias de espera após a cirurgia de ovariectomia, confeccionados os defeitos ósseos foram confeccionados tanto nos animais ovariectomizados quanto nos não ovariectomizados (grupo controle).

Os animais foram pesados e anestesiados com a solução anestésica de xilazina (Hertape Calier - Juatuba, MG, Brasil) e cloridrato de cetamina - anestésico geral, fornecido pela União Química Farmacêutica Nacional S/A (Embu-Guaçu, SP, Brasil), na proporção de 75mg/Kg de cloridrato de cetamina e de 10mg/Kg de xilazina, injetada por via intraperitoneal.

Após tricotomia e antissepsia com álcool iodado, foi realizada uma incisão sagital de aproximadamente 1 cm de extensão na região lateral da calvária (osso parietal direito), com lâmina de bisturi estéril número 15, previamente montada em cabo de bisturi número 3, expondo a região óssea que se desejasse ter acesso.

Na calvária exposta foi confeccionado um defeito ósseo cilíndrico de 5 mm de diâmetro, na região central do osso parietal esquerdo utilizando um motor elétrico para implantes (Dentscler, Ribeirão Preto, SP, Brasil), ajustado em 3000rpm, e broca trefina (Neodent, Curitiba, PR, Brasil) de 5 mm de diâmetro adaptada em contra-ângulo, sob constante irrigação com soro fisiológico 0,9% (Figura 5a).

Após o procedimento cirúrgico, os animais ovariectomizados foram divididos aleatoriamente em três grupos, com relação a utilização ou não de membranas nos defeitos ósseos criados: Grupo OVX – não recebeu membrana; (Figura 5b); Grupo PTFE recebeu a membrana de politetrafluoretileno; Grupo PVDF – recebeu a membrana de politetrafluoretileno. Para os Grupos PTFE e PVDF foram utilizados 10 animais. Destes 10 animais, 5 foram utilizados para as análises tomográfica (micro-CT), histológica e

morfométrica. Os outros 5 animais foram utilizados para a avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real. O Grupo OVX foi constituído por 5 animais e nestes foram realizadas somente as análises tomográfica, histológica e morfométrica, já que estudos prévios demonstraram não haver formação óssea em defeitos não tratados em ratos saudáveis, portanto não possibilitando a análise por PCR em tempo real. O Grupo Controle também foi constituído por 5 animais (sham) que não recebeu nenhum tipo de tratamento e neste grupo foram realizadas as mesmas análises do Grupo OVX.

A distribuição dos animais por tratamento, tipos de análise a que foram submetidos e tempo experimental são apresentados no Quadro 1.

**Figura 5-** Em a: defeito ósseo confeccionado no osso parietal esquerdo e em b: membrana de titanato de bário inserida e adaptada no defeito ósseo



**Quadro 1-** Distribuição dos animais em relação ao tratamento, tipos de análises a que foram submetidos e tempo experimental

Grupos	Tipos de Análise	Tempo Experimental	Animais
Controle	Morfometria e Tomografia	4 semanas	n=5
OVX	Morfometria e Tomografia	4 semanas	n=5
PTFE	Morfometria e Tomografia	4 semanas	n=5
	PCR em tempo real	4 semanas	n=5
PVDF	Morfometria e Tomografia	4 semanas	n=5
	PCR em tempo real	4 semanas	n=5

Após a colocação ou não das membranas nos defeitos ósseos, procedeu-se à sutura dos tecidos. Os tecidos foram suturados com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) com a reposição da pele e do periósteo em sua posição original.

Ao final do procedimento cirúrgico os animais receberam dose única de analgésico Flunixinina meglumina (10 mg/100g peso corporal) (MSD Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil) e dose única de uma solução de antibióticos contendo: Benzilpenicilina benzatina (156.000 UI/100g peso corporal), Benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100g peso corporal), Benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100g peso corporal), Diidroestreptomicina base (sulfato) (65mg/100g peso corporal) e Estreptomicina base (sulfato) (65mg/100g peso corporal) (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge<sup>®</sup>, Campinas, SP, Brasil).

Os animais receberam ração e água “ad libitum”, e ficaram sob observação constante, sendo feita a limpeza de suas caixas, com troca da maravalha, três vezes por semana.

### 3.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Ao final de 4 semanas, período adequado para a avaliação da regeneração do tecido ósseo neste modelo experimental (SICCHIERI et al., 2012), os animais foram eutanasiados.

Os animais foram pesados e anestesiados com a solução anestésica de xilazina (Hertape Calier - Juatuba, MG, Brasil) e cloridrato de cetamina - anestésico geral, fornecido pela União Química Farmacêutica Nacional S/A (Embu-Guaçu, SP, Brasil), na proporção de 75mg/Kg de cloridrato de cetamina e de 10mg/Kg de xilazina, injetada por via intraperitoneal.

Após a decapitação, foram obtidos fragmentos ósseos contendo o defeito com margem de segurança (Figura 6).

**Figura 6-** Amostra de tecido ósseo contendo a área cicatricial com a membrana e tecido ósseo remanescente adjacente (margem de segurança)



### 3.8 ANÁLISE TOMOGRÁFICA

Para a realização da análise tomográfica, as calvárias foram fixadas em solução de formol 4% tamponado (pH=7) por 48 horas e transferidas para uma solução de etanol 70% onde permaneceram por 3 dias.

A análise tomográfica foi realizada por meio do microtomógrafo SkyScan 1172 de alta resolução (SkyScan, Kontish, Bélgica) operando com fonte de raios-X de 100 kV detectados por uma câmera de 11-megapixel com resolução de até 1  $\mu\text{m}$ . A aquisição dos dados foi realizada por meio da utilização de um software de aquisição de imagens 2D do próprio equipamento e as reconstruções 3D, necessárias para a análise, foram feitas pelo software NRecon (Bruker microCT, Kontish, Bélgica). O volume de interesse (5,0 mm de diâmetro e 2,0 mm de altura) foi determinado na área correspondente ao defeito ósseo criado e para a avaliação do tecido ósseo neoformado presente no volume de interesse adotou-se o “threshold” que variava entre 30 e 120, numa escala de cinza (0-255). Os softwares DataViewer versão 1.4.1 (SkyScan Kontish, Bélgica) e CT Analyser versão 1.11.8.0 (SkyScan, Kontish, Bélgica) permitiram a avaliação dos seguintes parâmetros: volume de tecido ósseo ( $\text{mm}^3$ ), superfície óssea ( $\text{mm}^2$ ), superfície óssea específica ( $\text{mm}^2/\text{mm}^3$ ), número de trabéculas (1/mm), espessura das trabéculas (mm), distância entre as trabéculas (mm) e densidade de conectividade (1/ $\text{mm}^3$ ). Estes parâmetros, automaticamente gerados pelo software, são preconizados pela American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) e descritos por Parfitt et al. (1987).

### 3.9 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após a análise tomográfica, os espécimes foram preparados para a obtenção de cortes histológicos não-descalcificados. Optou-se por esta metodologia porque a membrana de PVDF danifica a lâmina de micrótomos convencionais utilizados para cortes histológicos descalcificados e conseqüentemente não produz material histológico de boa qualidade. Foi feita a desidratação das amostras em série crescente de álcoois e as mesmas foram incluídas em resina acrílica (LR White Hard Grade, Londres, Inglaterra). Para a impregnação de resina acrílica, as peças foram submetidas ao vácuo e agitadas 2 horas por dia, durante 15 dias, sendo que a resina acrílica era substituída a cada 2 dias. Os blocos foram colocados em estufa a 60°C por 12 horas para polimerização e posteriormente seccionados ao meio utilizando, para isso, um micrótomo de precisão (Exakt, Apparatebeau, Alemanha). De cada espécime foram obtidas duas lâminas para coloração e observação em microscopia de luz.

Para isso, colou-se a face polida a uma lâmina acrílica (Exakt, Apparatebau, Alemanha) e o bloco foi novamente cortado. Desta forma, obteve-se um corte de aproximadamente 40  $\mu\text{m}$  de espessura aderido à lâmina, e este foi desgastado e polido até apresentar aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de espessura. Esta face foi submetida à coloração utilizando os corantes azul de Stevenel e vermelho de Alizarina, conforme descrito por Maniatopoulos (1986).

A análise histológica foi focada no tecido ósseo neoformado, com relação à presença de osso imaturo e/ou trabecular, tecido osteoide, osteoblastos, osteócitos e estruturas sugestivas de vasos sanguíneos, como descrito previamente por Sicchieri et al. (2012).

### 3.10 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

As calvárias das ratas foram retiradas por meio de uma trefina (Neodent, Curitiba, PR, Brasil) de igual tamanho às membranas, que haviam sido inseridos no defeito ósseo. A retirada das calvárias foi realizada com irrigação constante de solução de PBS (tampão fosfato salino) (Life Technologies-Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) gelado, a fim de minimizar uma possível degradação de RNA total devido ao aquecimento promovido pelo uso da trefina. Após a retirada, as calvárias foram congeladas imediatamente no nitrogênio líquido e armazenadas no freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração de RNA total das mesmas.

Para a extração de RNA total, as calvárias foram maceradas com auxílio de cadinho, pistilo e nitrogênio líquido, até apresentarem aspecto de um pó fino. Tanto o cadinho quanto o pistilo foram previamente queimados em forno seco a  $180^{\circ}\text{C}$  por 6 horas para degradação de RNAses, enzimas capazes de promover a degradação de RNA (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Na sequência, foram adicionados 1,5mL do reagente Trizol (Life Technologies-Invitrogen) no cadinho para a coleta e homogeneização do pó da amostra previamente macerada. Em seguida, o trizol + pó da amostra macerada foram transferidos para um tubo (Axygen Scientific Inc., Union City, California, EUA) sendo adicionados 200 $\mu\text{L}$  de clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, Nova Jersey, EUA). Os tubos foram vigorosamente agitados por 30s e mantidos no gelo durante 5min. A seguir, as amostras foram centrifugadas a  $4^{\circ}\text{C}$  e 12000g, por 15min, e a fase aquosa (superior) coletada em novos tubos de 2mL (Axygen Scientific Inc.). Em seguida, foram adicionados 250 $\mu\text{L}$  de etanol 96% (Merck, Whitehouse Station, Nova Jersey, EUA) às amostras e as mesmas centrifugadas em colunas de sílica gel presentes no kit SV Total RNA Isolation

System (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). O restante do processo de extração de RNA total foi realizado de acordo com instruções do fabricante do kit.

A concentração e pureza do RNA total foram avaliadas por espectrofotometria em aparelho NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, Uppsala, Condado de Uppsala, Suécia). A leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm e 230 nm, para obtenção da concentração de RNA/ $\mu$ L e avaliação da contaminação por proteínas e fenol, respectivamente.

### **3.11 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RNA TOTAL**

A qualidade das amostras de RNA total foi determinada por meio de eletroforese microfluídica utilizando o aparelho Bioanalyzer 2100 Agilent e os chips RNA 6000 Nano Chips (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, USA).

Antes de iniciar o preparo do gel para a eletroforese, todos os reagentes foram mantidos por 15 minutos em temperatura ambiente. Decorrido esse período, foi realizada a preparação do gel pipetando-se 550 $\mu$ l do RNA 600 Nano Gel em uma coluna com filtro seguido de centrifugação por 10min a 1500g, à temperatura ambiente. Após centrifugação, uma alíquota de 65 $\mu$ l foi colocada num tubo (Axygen Scientific Inc.) de 0,5ml e, em seguida, adicionada 1 $\mu$ l do RNA 6000 Nano Dye. O tubo foi agitado por 10 segundos e centrifugado por 10min a 13000g, em temperatura ambiente (mistura gel/dye). Em seguida, foram pipetados 9 $\mu$ l da mistura gel/dye na região G indicada no RNA 6000 Nano Chip inserido na estação de trabalho. Com o auxílio de uma seringa acoplada à estação de trabalho foi exercida a pressão necessária para distribuição do gel por todo o chip. Em seguida, foram pipetados 9 $\mu$ l da mistura gel/dye nos demais pontos indicados com a letra G. Na sequência, foram pipetados: 1 $\mu$ l do marcador na posição indicada e 5 $\mu$ l do RNA 6000 Nano Marker em cada posição relacionada às amostras assim como na posição do marcador. Por último, 1 $\mu$ l de cada amostra (cerca de 100-150 ng de RNA total) foi adicionado nos respectivos poços sendo o chip agitado no aparelho tipo vórtex IKA MS 3 (IKA, Manca, Hong Kong, China) por 1min a 2200rpm. O chip foi inserido no aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) e com o auxílio do software Agilent 2100 Expert Software foi gerado o resultado final (eletroforograma, densitometria dos géis e valor de RIN – RNA Integrity Number). A integridade do RNA ribossômico foi verificada pela visualização de duas subunidades ribossômicas características de células eucarióticas (18S e 28S), sendo consideradas amostras viáveis para a realização dos ensaios de Real time PCR aquelas que apresentaram valores de RIN acima de 7,5.

### 3.12 SÍNTESE DA FITA DE DNA COMPLEMENTAR

O DNA complementar (DNAC) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total por reação de transcrição reversa utilizando-se o kit High-capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Life Technologies-Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, em um tubo de 200 µL (Axygen Scientific Inc.) foram adicionados: 1µg de RNA total diluído em um volume final de 10µL de água previamente tratada com DEPC (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), 2µL de (10X) RT buffer, 0,8µL de (25X) dNTP mix (100mM), 2µL (10X) RT Random Primers, 1µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 1µL de RNase Inhibitor e 3,2µL de água DEPC, para um volume final de 20 µL/reação. Em seguida, as amostras foram incubadas em termociclador Master Cycler Gradiente (Eppendorf AG, Hamburg, Hamburg, Alemanha) sob as seguintes condições: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, 85°C por 5 min, seguido pelo resfriamento a 4°C. Ao final da reação de transcrição reversa as amostras de DNAC foram estocadas em freezer -20°C.

### 3.13 EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA DIFERENCIAÇÃO OSTEOBLÁSTICA E OSTEOCLÁSTICA POR PCR EM TEMPO REAL

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan (Life Technologies-Invitrogen), no aparelho StepOne Plus (Life Technologies-Invitrogen) (Tabela 1). As reações de PCR em tempo real foram realizadas em quadruplicata com volume final de 10 µL e quantidade de cDNA correspondente a 11,25 ng de RNA total (pool de 04 animais em função do baixo rendimento de RNA total por animal). A reação de amplificação foi composta por: 50°C por 2 min; 95°C por 10 min, e 40 ciclos a 95°C por 15 s e 60°C por 1 min (desnaturação e extensão).

Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (ciclo treshold), sendo esse o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras), que permitiu a análise quantitativa da expressão do gene avaliado. Como controle endógeno, foi avaliada a estabilidade da expressão de 04 genes de referência: a) actb (beta actina), hprt1 (hipoxantina forofribosiltransferase), B2m (beta-2 icroglobulina) e gapdh (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). Para avaliar a estabilidade de expressão do gene de referência foi utilizado o software Data Assit v3.01 (Life Technologies-Invitrogen), capaz de gerar um gráfico mostrando os Cts de cada gene de referência nos dois grupos avaliados. A partir deste gráfico, o software calculou a variação da expressão gênica

por meio de um valor de escore, sendo que quanto menor o escore (próximo à zero), maior a estabilidade da expressão do gene. Os genes de referência que apresentaram menores valores de escore foram selecionados como possíveis candidatos para normalização dos dados de Real-time PCR. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada uma das sondas utilizadas. O método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) foi utilizado para determinar a expressão dos genes alvos envolvidos nos processos de diferenciação de osteoblastos e osteoclastos.

**Tabela 1** - Sondas TaqMan utilizadas nos ensaios de PCR em tempo real

Símbolo do Gene	Nome do Gene	Ensaio TaqMan
actb	beta actina	4352931E
Hprt1	hipoxantina fororibosiltransferase	Rn01527840_m1
B2m	beta-2 microglobulina	Rn00560865_m1
gapdh	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Rn99999916_s1
runx2	fator de transcrição relacionado ao gene runt 2	Rn01512298_m1
alpl	fosfatase alcalina fígado/osso/rim	Rn01516028_m1
ibsp	sialoproteína óssea	Rn00561414_m1
bglap	proteína óssea que contém ácido gamma-carboxiglutamico (osteocalcina/oc)	Rn00566386_g1
Spp1	fosfoproteína secretada 1 (osteopontina/opn)	Rn01449972_m1
SP7	Sp7 transcription fator (osterix/osx)	Rn02769744_s1
Tnfrsf11b	superfamília de receptor de fator de necrose tumoral, membro 11b (osteoprotegerina/opg)	Rn00563499_m1
Tnfrsf11a	superfamília de receptor de fator de necrose tumoral, membro 11a (rank)	Rn04340164_m1
Tnfsf11	superfamília de receptor de fator de necrose tumoral, membro 11 (rankl)	Rn00589289_m1
ctsk	catepsina K	Rn00580723_m1
mmp9	matrix metallopeptidase 9	Rn00579162_m1
calcr	receptor de calcitonina	Rn00562334_m1

### 3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados das avaliações histomorfométrica e de expressão gênica foram tabulados e submetidos à análise estatística utilizando o software Sigma Plot 11.0 (Systat Software, San Jose, California, EUA), para  $p < 0,05$ . O teste de Kolmogorov-Smirnov permitiu verificar que os dados seguiram uma distribuição normal. Foi aplicado o teste Anova, seguido pelo teste de Holm-Sidak quando apropriado, para os dados histomorfométricos e Teste  $t$  para os dados de expressão gênica.



## ***4. RESULTADOS***

---



## 4. RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A análise histológica da calvária dos animais controles (não ovariectomizados, sem a presença das membranas) mostrou uma pequena formação óssea na região de periferia do defeito e o restante estava preenchido por tecido conjuntivo (Figuras 7-10). Por outro lado nos animais que sofreram ovariectomia, foi possível observar maior espaçamento entre as trabéculas ósseas neoformadas culminando com maior quantidade de tecido conjuntivo nesta região. Também pode ser observado que o tecido conjuntivo ocupando a região do defeito criado nos animais do grupo ovariectomizado se apresentou mais delgado quando comparado àquele que preenchia o defeito ósseo dos animais do grupo controle (Figuras 7 e 9).

Nos animais que receberam as membranas de PTFE e PVDF foi observada uma neoformação óssea nos defeitos criados cirurgicamente, além de ausência de infiltrado inflamatório na região avaliada, assim como nos tecidos circunjacentes (Figuras 11-14).

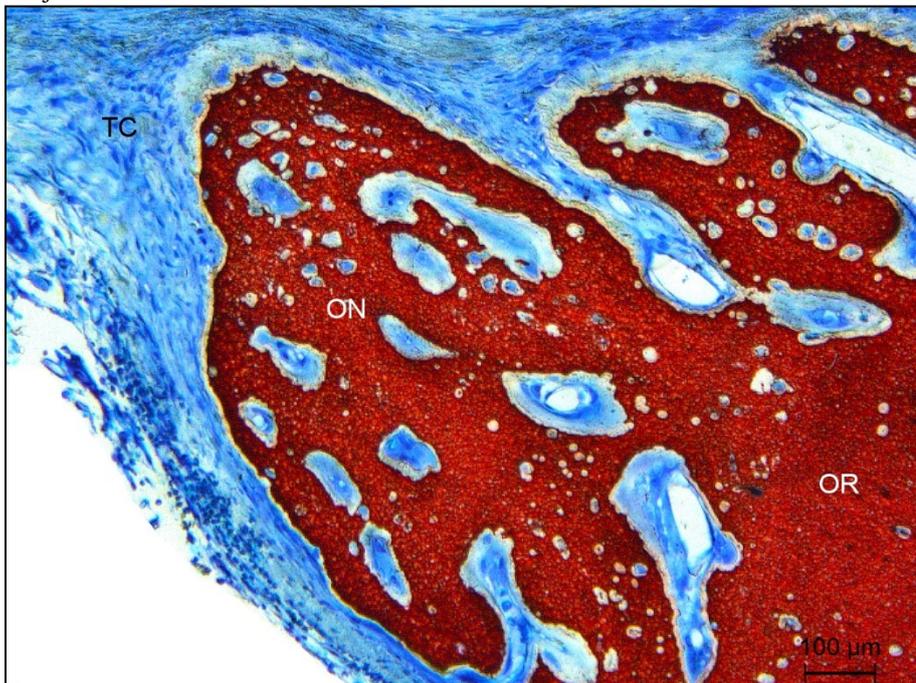
A membrana de PTFE apresentou-se em íntimo contato com o tecido ósseo neoformado (Figura 11) e em maior aumento estruturas como vasos sanguíneos no tecido conjuntivo medular puderam ser observadas entremeando as trabéculas ósseas (Figura 12).

A membrana de PVDF permitiu o crescimento de novas trabéculas ósseas acima e abaixo de sua estrutura, apesar de não apresentar íntimo contato com o osso neoformado como observado para a membrana de PTFE (Figura 13). Em maior aumento foi possível observar a presença de tecido conjuntivo com vasos sanguíneos entre as trabéculas de osso neoformado entremeadas com tecido conjuntivo medular (Figura 14).

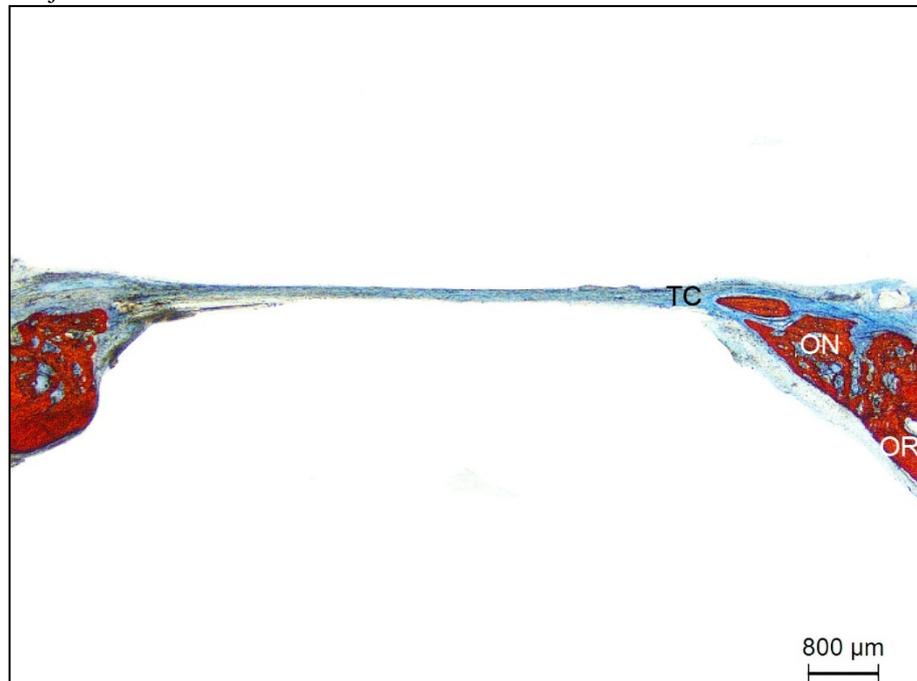
**Figura 7-** Fotomicrografia do defeito ósseo em animal do grupo controle que não recebeu membrana. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado e TC: tecido conjuntivo



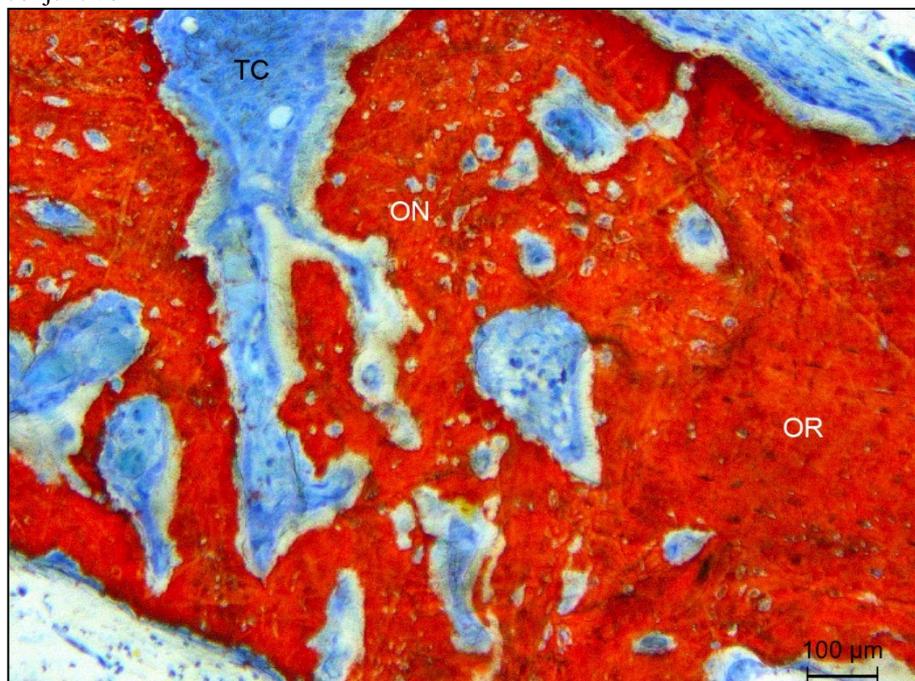
**Figura 8-** Fotomicrografia do defeito ósseo em animal do grupo controle que não recebeu membrana. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado e TC: tecido conjuntivo



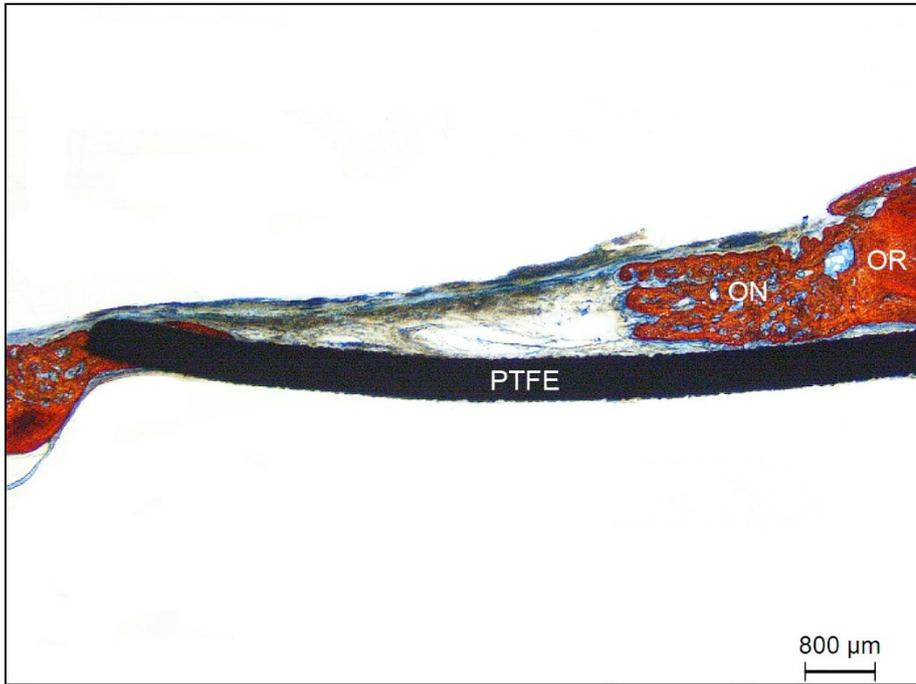
**Figura 9-** Fotomicrografia do defeito ósseo em animal do grupo ovariectomizado que não recebeu membrana. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado e TC: tecido conjuntivo



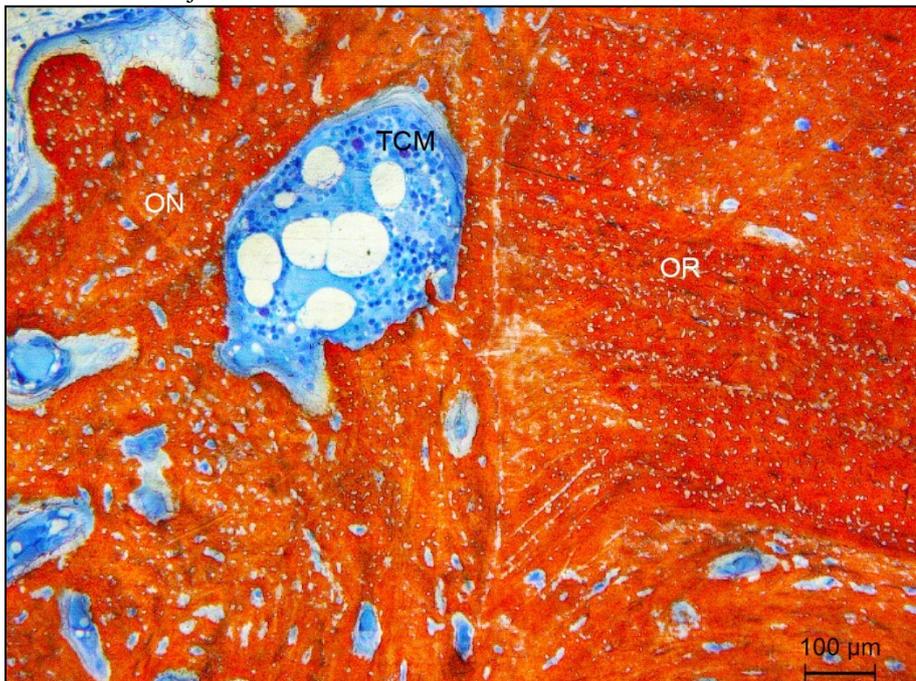
**Figura 10-** Fotomicrografia de alta potência do defeito ósseo em animal do grupo ovariectomizado que não recebeu membrana. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado e TC: tecido conjuntivo



**Figura 11-** Fotomicrografia do defeito ósseo em animal ovariectomizado que recebeu a membrana de PTFE. OR: osso remanescente e ON: osso neoformado



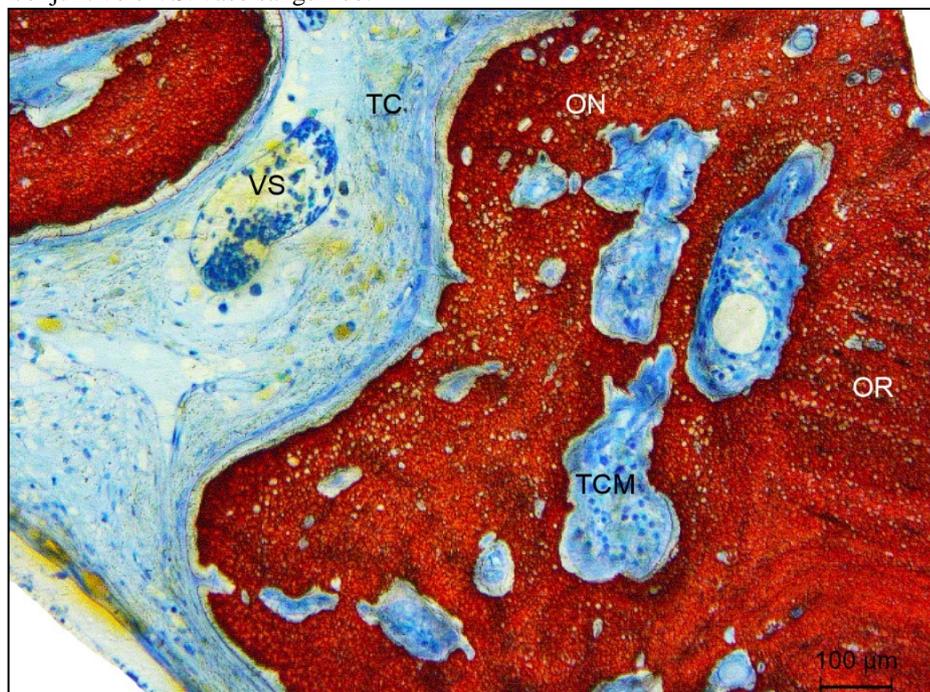
**Figura 12-** Fotomicrografia de alta potência do defeito ósseo em animal ovariectomizado que recebeu a membrana de PTFE. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado e TCM: tecido conjuntivo medular



**Figura 13-** Fotomicrografia do defeito ósseo em animal ovariectomizado que recebeu a membrana de PVDF (TB - titanato de bário). OR: osso remanescente e ON: osso neoformado



**Figura 14-** Fotomicrografia do defeito ósseo em animal ovariectomizado que recebeu a membrana de PVDF. OR: osso remanescente; ON: osso neoformado, TC: tecido conjuntivo e VS: vaso sanguíneo.

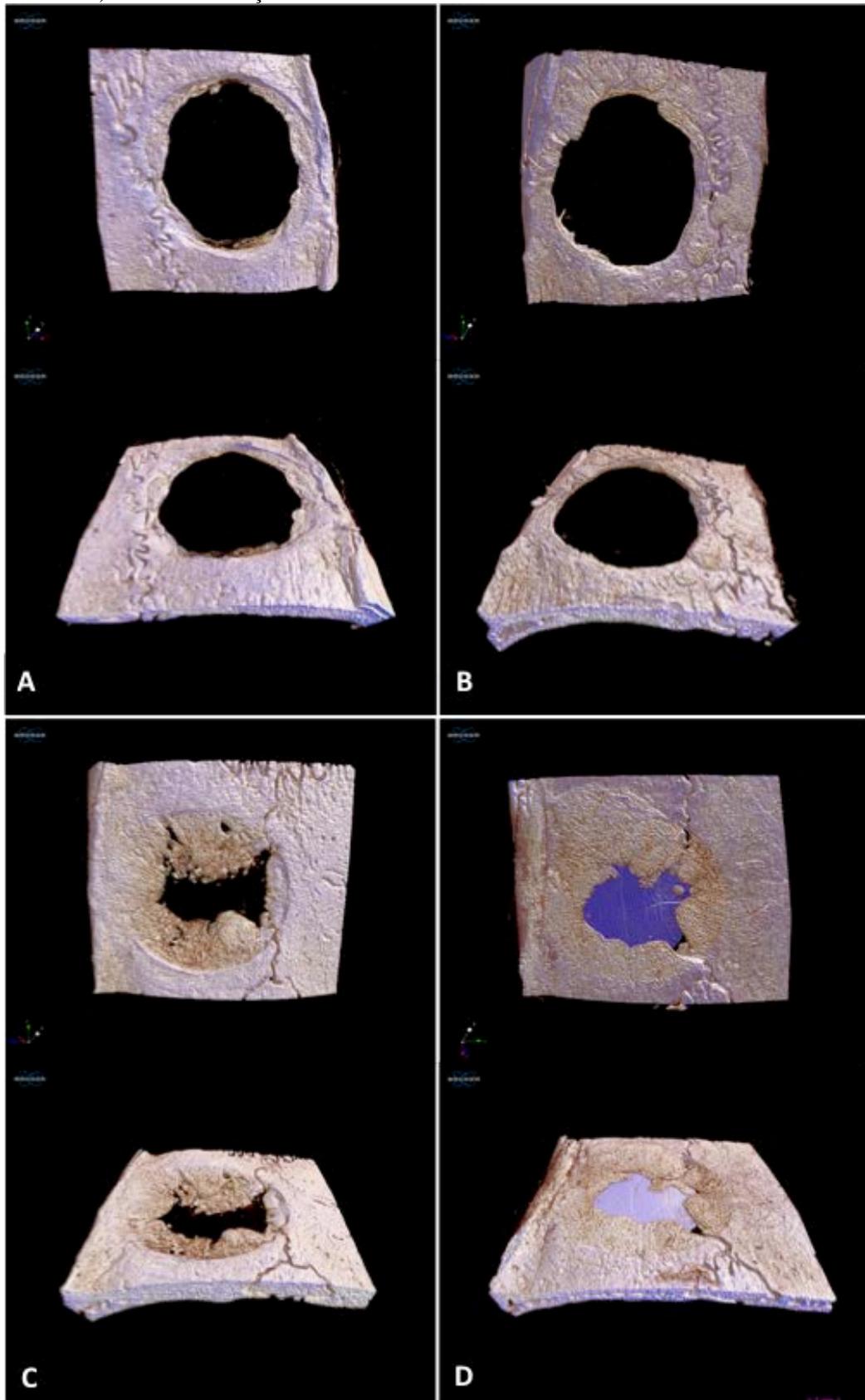


## **4.2 RESULTADOS DA ANÁLISE TOMOGRÁFICA**

Os resultados encontrados na análise tomográfica estão representados nas Figuras 15 a 22 e nas Tabelas 2 a 7.

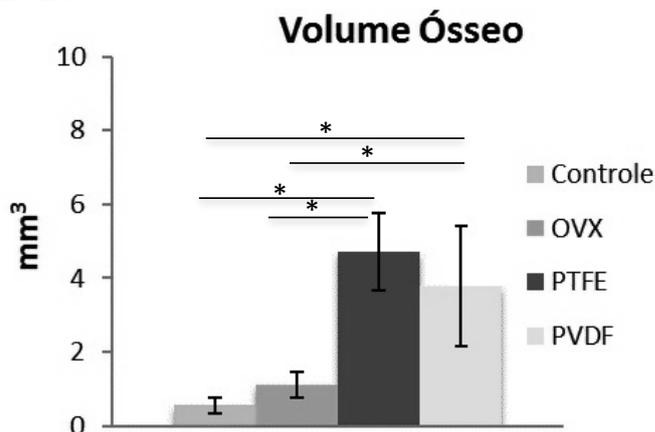
Após reconstrução por micro-CT, foi possível observar nas imagens tridimensionais, que a formação óssea nos defeitos dos grupos Controle e Ovariectomizado foi insignificante. As imagens também evidenciaram que houve formação óssea tanto grupo que recebeu a membrana de PTFE como no que recebeu a membrana de PVDF (Figura 15).

**Figura 15-** Imagem tridimensional (superior e pósterio-superior) dos defeitos ósseos nos diferentes grupos. Em A: Controle; B: Ovariectomizado; C: Membrana de PTFE e D: Membrana de PVDF. Observa-se a pequena formação óssea em A e B (defeitos ósseos que não receberam membrana) e a maior formação óssea em C e D



O valor médio do volume ósseo foi um pouco menor quando comparado o Grupo PVDF com o Grupo PTFE, porém sem significância estatística. Tanto a membrana de PVDF como a de PTFE induziram a um volume ósseo significativamente maior quando comparados aos Grupos Controle e Ovariectomizado (OVX) ( $p < 0,05$ ) (Figura 16 e Tabela 2).

**Figura 16-** Volume ósseo ( $\text{mm}^3$ ) nos Grupos Controle, Ovariectomizado (OVX), PTFE e PVDF. \* Indica diferença estatística significante

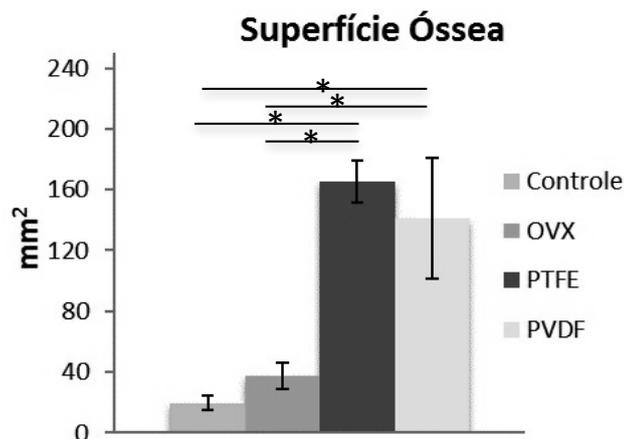


**Tabela 2-** Significância ( $p$ ) entre os grupos analisados para o parâmetro volume ósseo. Teste de Holm-Sidak ( $p < 0,05$ )

Volume Ósseo	
Grupos	$P$
PTFE x C	<0,001
PTFE x OVX	<0,001
PVDF x C	<0,001
PVDF x OVX	0,002
PTFE x PVDF	0,208
OVX x C	0,443

Os Grupos que receberam a membrana de PTFE e PVDF apresentaram a superfície óssea significativamente maior quando comparados aos Grupos Controle e Ovariectomizado (OVX) ( $p < 0,05$ ) (Figura 17 e Tabela 3).

**Figura 17-** Superfície óssea ( $\text{mm}^2$ ) nos Grupos Controle, Ovariectomizado (OVX), que recebeu a membrana de PTFE e que recebeu a membrana PVDF. \* Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ )

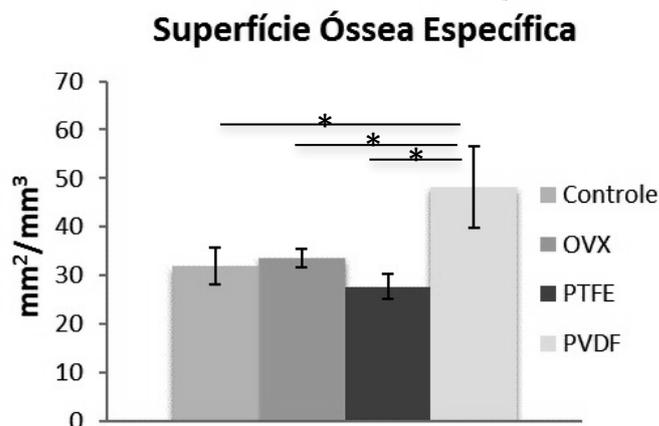


**Tabela 3 -** Significância ( $p$ ) entre os grupos analisados para o parâmetro superfície óssea. Teste de Holm-Sidak ( $p < 0,05$ )

Superfície Óssea	
Grupos	$P$
PTFE x C	<0,001
PTFE x OVX	<0,001
PVDF x C	<0,001
PVDF x OVX	<0,001
PTFE x PVDF	0,144
OVX x C	0,265

O Grupo que recebeu a membrana de PVDF apresentou superfície óssea específica significativamente maior quando comparado aos grupos PTFE, Controle e Ovariectomizado (OVX) ( $p < 0,05$ ) (Figura 18 e Tabela 4).

**Figura 18-** Superfície óssea específica ( $\text{mm}^2/\text{mm}^3$ ) nos Grupos Controle, Ovariectomizado (OVX), que recebeu a membrana de PTFE e que recebeu a membrana PVDF. \* Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

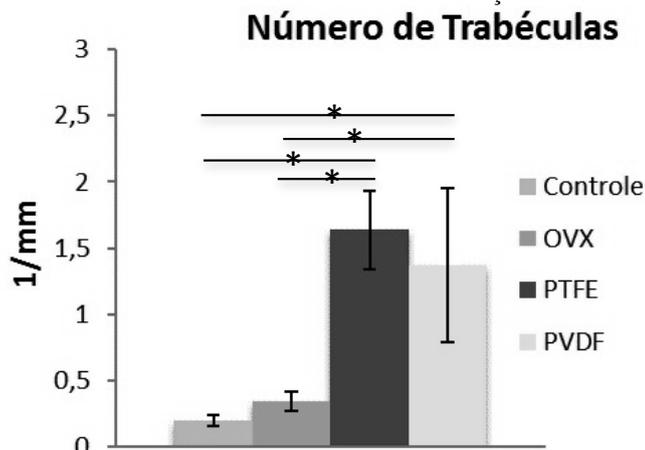


**Tabela 4** - Significância ( $p$ ) entre os grupos analisados para o parâmetro superfície óssea específica. Teste de Holm-Sidak ( $p < 0,05$ )

<b>Superfície Óssea Específica</b>	
<b>Grupos</b>	<b><i>P</i></b>
PTFE x C	0,257
PTFE x OVX	0,119
PVDF x C	<b>&lt;0,001</b>
PVDF x OVX	<b>0,001</b>
PTFE x PVDF	<b>&lt;0,001</b>
OVX x C	0,632

Para o parâmetro número de trabéculas, não houve diferença estatística entre os Grupos que utilizaram as membranas PVDF e PTFE. Houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparados os Grupos que receberam as membranas e os que não receberam (Figura 19 e Tabela 5).

**Figura 19-** Número de trabéculas (1/mm) nos Grupos Controle, Ovariectomizado (OVX), que recebeu a membrana de PTFE e que recebeu a membrana PVDF. \* Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ )

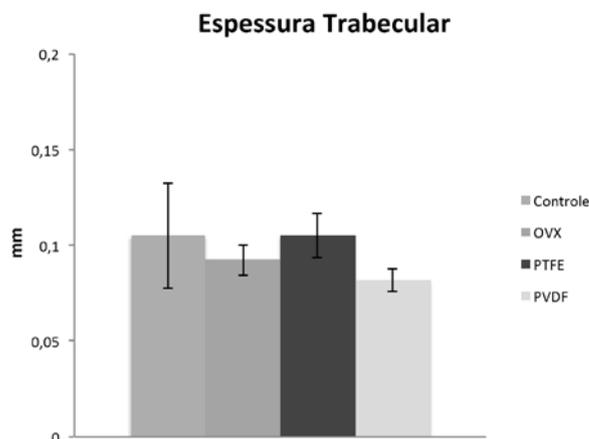


**Tabela 5 -** Significância ( $p$ ) entre os grupos analisados para o parâmetro número de trabéculas. Teste de Holm-Sidak ( $p < 0,05$ )

Número de Trabéculas	
Grupos	$P$
PTFE x C	<0,001
PTFE x OVX	<0,001
PVDF x C	<0,001
PVDF x OVX	<0,001
PTFE x PVDF	0,280
OVX x C	0,551

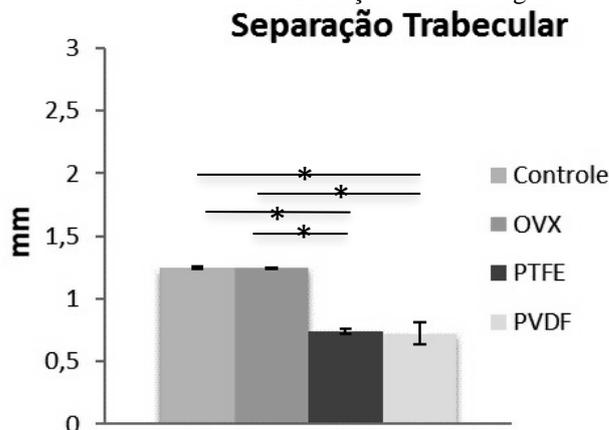
A espessura trabecular não foi afetada pela utilização das membranas. Assim, não houve diferença estatística quando comparados os animais dos grupos que receberam os diferentes tipos de membrana e aqueles que não receberam ( $p=0,084$ ) (Figura 20).

**Figura 20.** Espessura trabecular (mm) nos Grupos Controle, Ovariectomizado (OVX), que recebeu a membrana de PTFE e que recebeu a membrana PVDF.



No parâmetro separação trabecular, os valores foram significativamente menores para os Grupos PTFE e PVDF quando comparados com o Grupo Controle e Ovariectomizado (OVX) ( $p < 0,05$ ) (Figura 21 e Tabela 6).

**Figura 21-** Separação trabecular (mm) nos Grupos Controle, Ovariectomizado (OVX), que recebeu a membrana de PTFE e que recebeu a membrana PVDF. \* Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

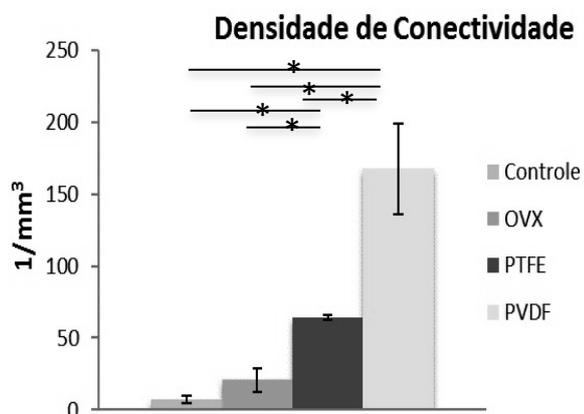


**Tabela 6** - Significância ( $p$ ) entre os grupos analisados para o parâmetro separação trabecular. Teste de Holm-Sidak ( $p < 0,05$ )

Separação Trabecular	
Grupos	$P$
PTFE x C	<b>&lt;0,001</b>
PTFE x OVX	<b>&lt;0,001</b>
PVDF x C	<b>&lt;0,001</b>
PVDF x OVX	<b>&lt;0,001</b>
PTFE x PVDF	0,581
OVX x C	0,958

Para o parâmetro densidade de conectividade, o Grupo PVDF apresentou valor significativamente maior quando comparado com os Grupos PTFE, Controle e Ovariectomizado (OVX). O grupo PTFE também apresentou valor significativamente maior quando comparado aos grupos Controle e Ovariectomizado (OVX) ( $p < 0,05$ ), (Figura 22 e Tabela 7).

**Figura 22-** Densidade de conectividade ( $1/\text{mm}^3$ ) nos Grupos Controle, Ovariectomizado (OVX), que recebeu a membrana de PTFE e que recebeu a membrana PVDF. \* Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ )



**Tabela 7 -** Significância ( $p$ ) entre os grupos analisados para o parâmetro densidade de conectividade. Teste de Holm-Sidak ( $p < 0,05$ )

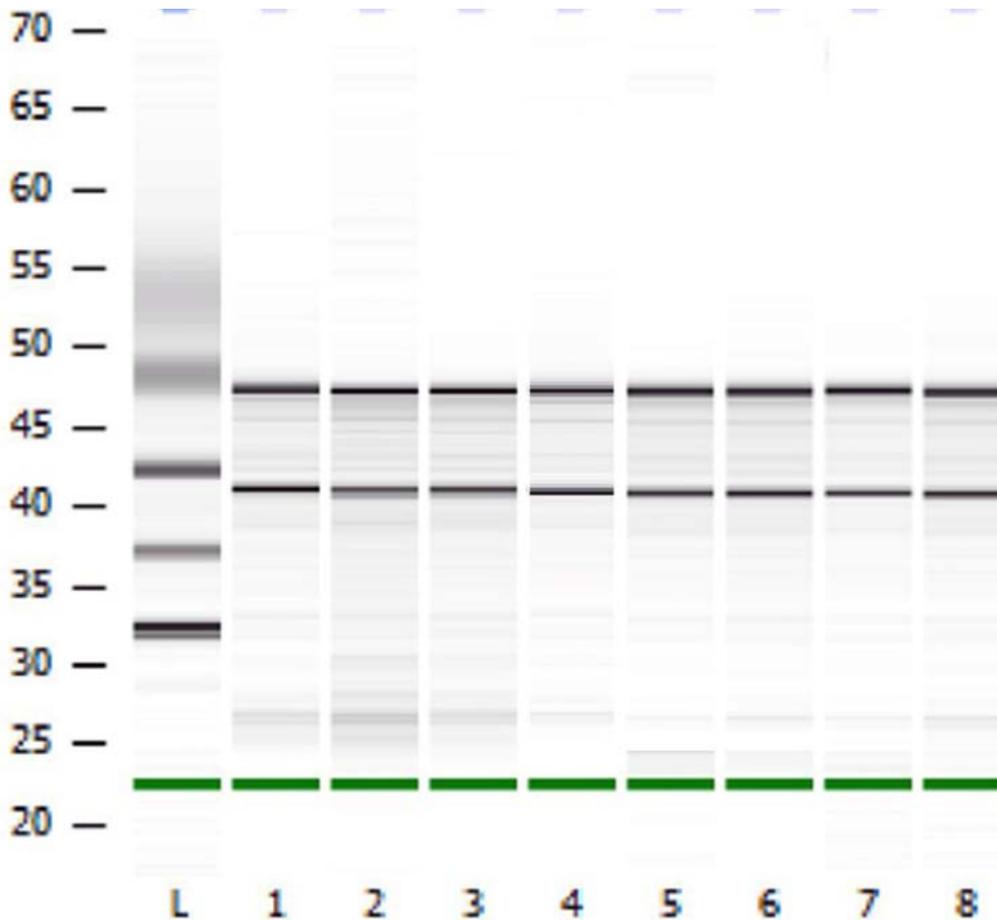
Densidade de Conectividade	
Grupos	$P$
PTFE x C	<b>0,001</b>
PTFE x OVX	<b>0,003</b>
PVDF x C	<b>0,001</b>
PVDF x OVX	<b>0,001</b>
PTFE x PVDF	<b>0,001</b>
OVX x C	0,269

### 4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

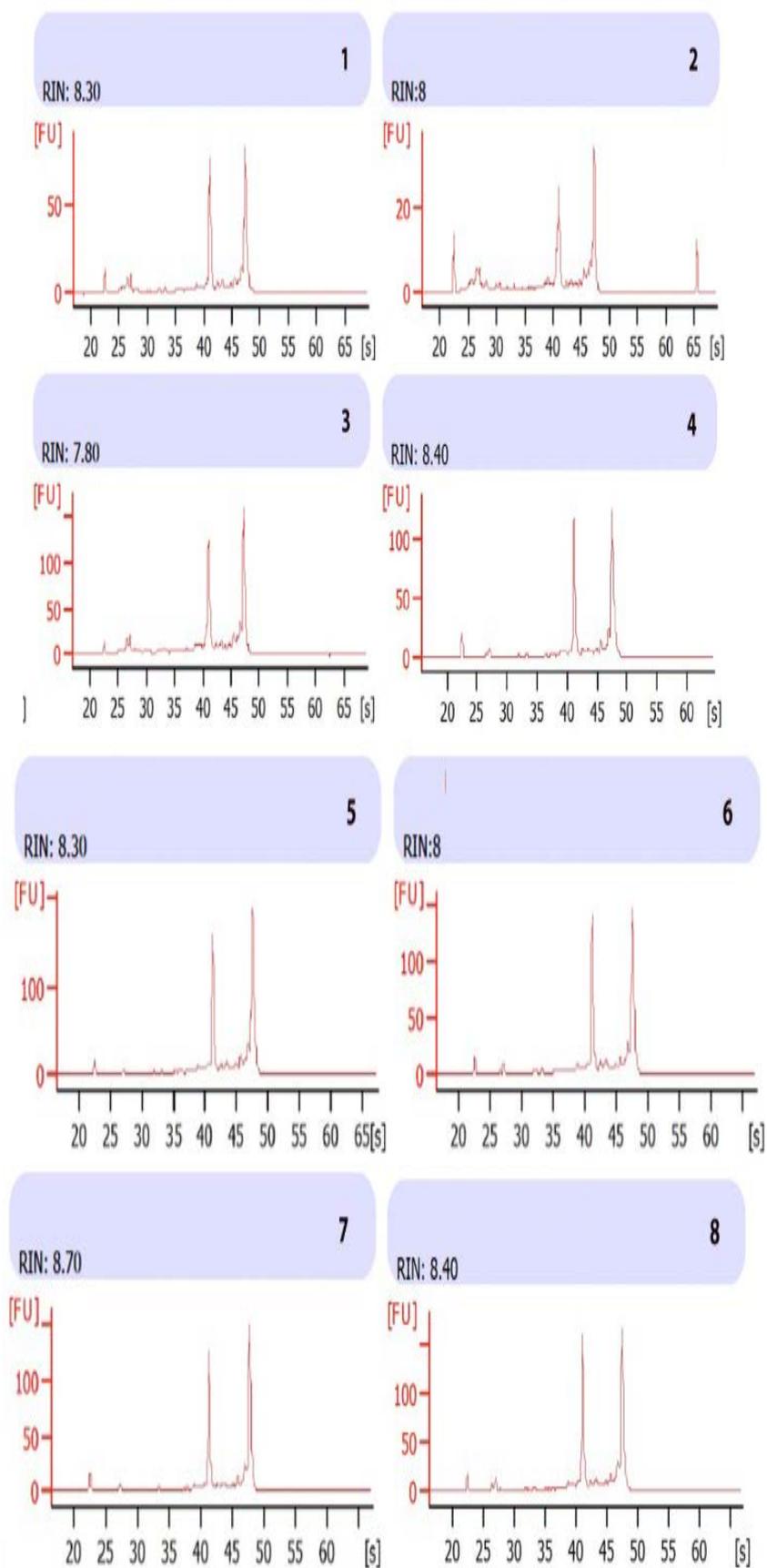
#### 4.3.1 INTEGRIDADE DO RNA

A integridade do RNA foi verificada previamente aos ensaios de PCR em tempo real pela visualização de duas subunidades ribossômicas características de células eucarióticas (18S e 28S). Como foi relatado anteriormente, essa análise foi realizada por meio do aparelho *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Foram consideradas amostras viáveis para realização do PCR em tempo real aquelas que apresentavam valores de RIN superiores a 7,5 (escores variando de 0 a 10).

**Figura 23-** Ensaio de integridade do RNA ribossômico. Amostras 1-4 (PTFE); amostras 5-8 (PVDF).



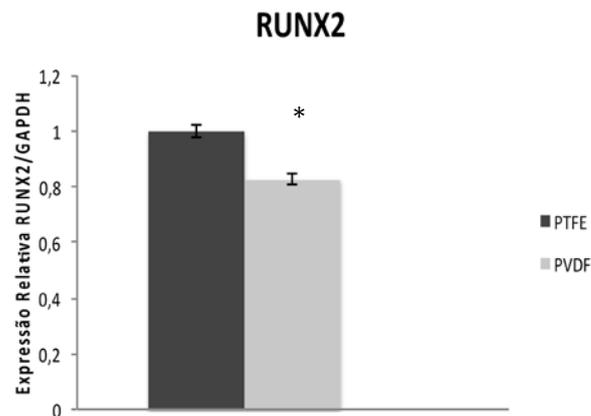
**Figura 24-** Eletroferograma do gel de integridade do RNA ribossômico. Presença dos picos referentes as bandas 18S e 28S. Amostras 1-4 (PTFE); amostras 5-8 (PVDF)



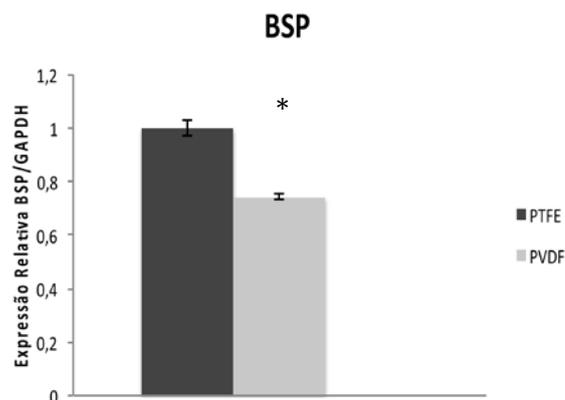
### 4.3.2 EXPRESSÃO DE MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO OSTEoblástica POR PCR EM TEMPO REAL

As expressões gênicas do fator de transcrição 2 com domínio Runt (RUNX2), sialoproteína óssea (BSP), osteopontina (OPN), osterix (OSX) e ligante do receptor para a ativação do fator nuclear *kappa* B (RANKL) foram afetadas frente aos diferentes tipos de membrana utilizadas ( $p < 0,05$ ). Os resultados indicaram menores níveis de RNAm nas células dos animais tratados com a membrana de PVDF (Figuras 25-29).

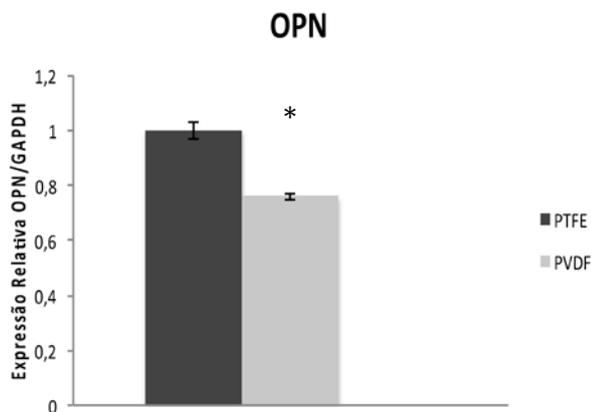
**Figura 25-** Expressão relativa de RUNX2 em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \* Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ )



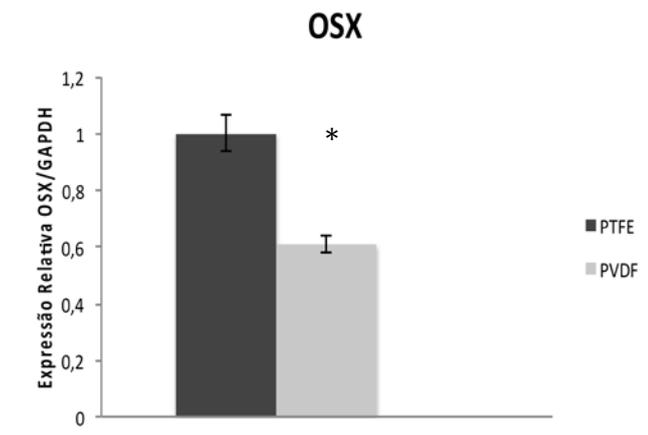
**Figura 26-** Expressão relativa de BSP em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \* Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ )



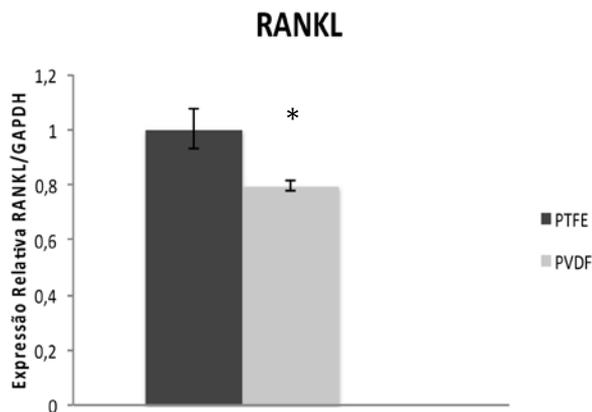
**Figura 27-** Expressão relativa de OPN em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \* Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ )



**Figura 28-** Expressão relativa de OSX em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \* Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

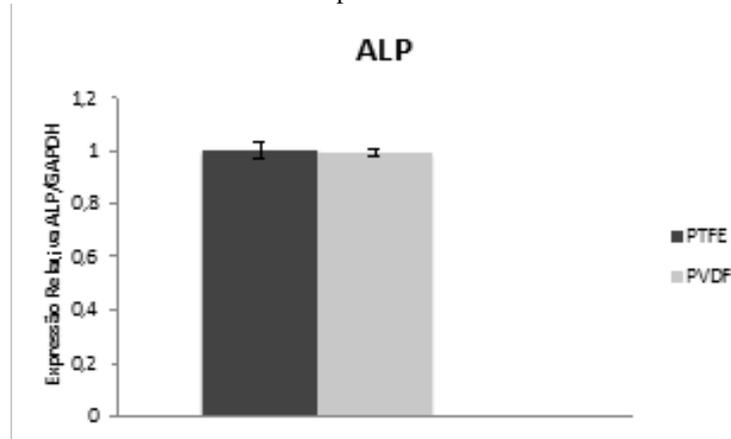


**Figura 29-** Expressão relativa de RANKL em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \* Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ )

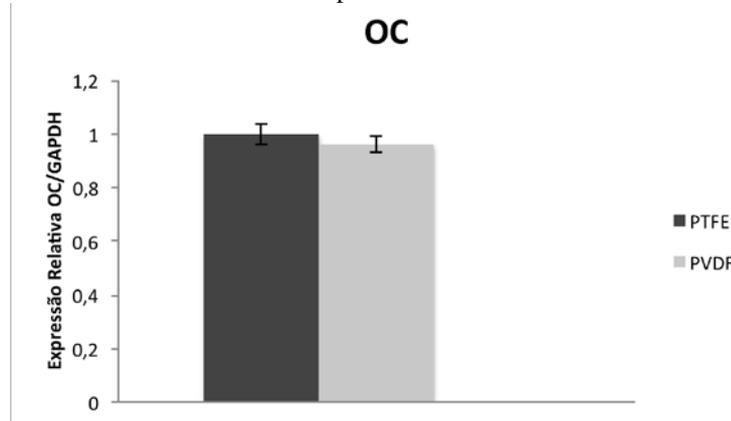


As expressões gênicas da fosfatase alcalina (ALP) e da osteocalcina (OC) no Grupo PVDF foram semelhantes quando comparadas com o Grupo PTFE (Figuras 30 e 31).

**Figura 30-** Expressão relativa de ALP em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão

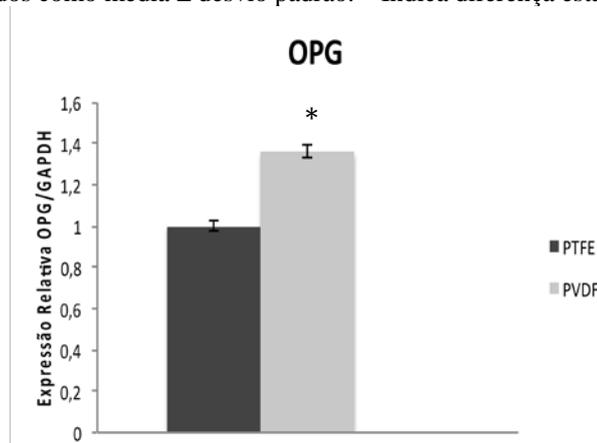


**Figura 31-** Expressão relativa de OC em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão



A modulação do gene osteoprotegerina (OPG) foi significativamente maior no Grupo PVDF quando comparada com o Grupo PTFE (Figura 32).

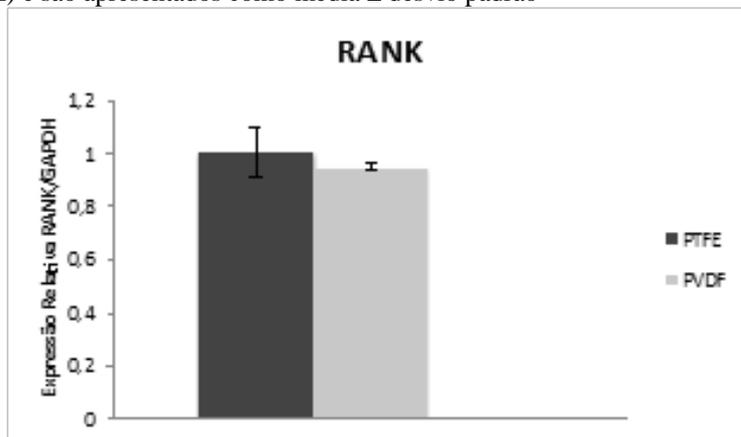
**Figura 32-** Expressão relativa de OPG em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \* Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ )



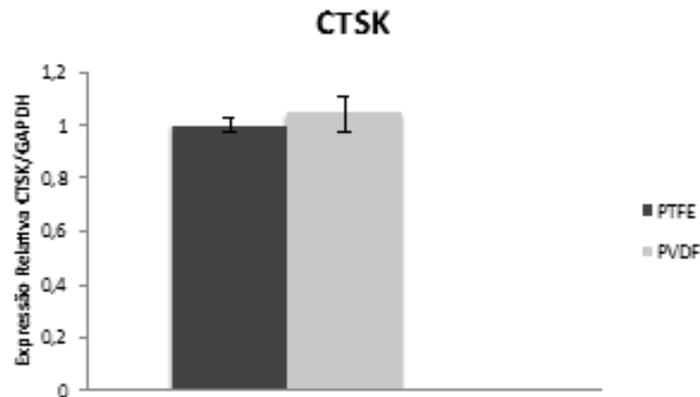
#### 4.3.3 EXPRESSÃO DE MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOCLÁSTICA POR PCR EM TEMPO REAL

As expressões gênicas do receptor para a ativação do fator nuclear *kappa* B (RANK) e da catepsina K (CTSK) no Grupo PVDF foram semelhantes quando comparadas com o Grupo PTFE (Figuras 33 e 34).

**Figura 33-** Expressão relativa de RANK em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão

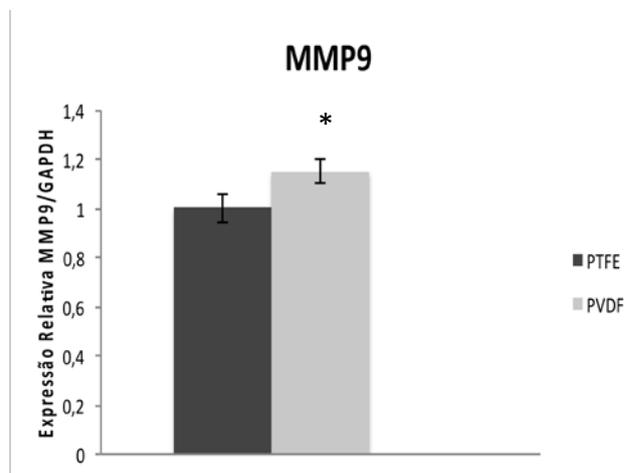


**Figura 34-** Expressão relativa de CTSK em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratos e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão

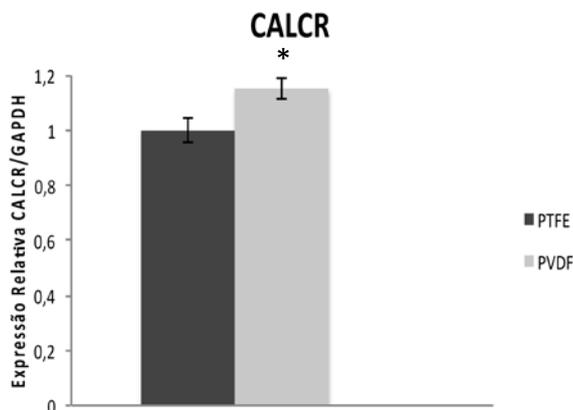


As expressões dos genes metaloproteinase-9 da matriz (MMP-9) e receptor para a calcitonina (CALCR) foram significativamente maiores no Grupo PVDF quando comparadas com o Grupo PTFE (Figuras 35 e 36).

**Figura 35-** Expressão relativa de MMP-9 em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratos e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \* Indica diferença estatística significante ( $p < 0,05$ )

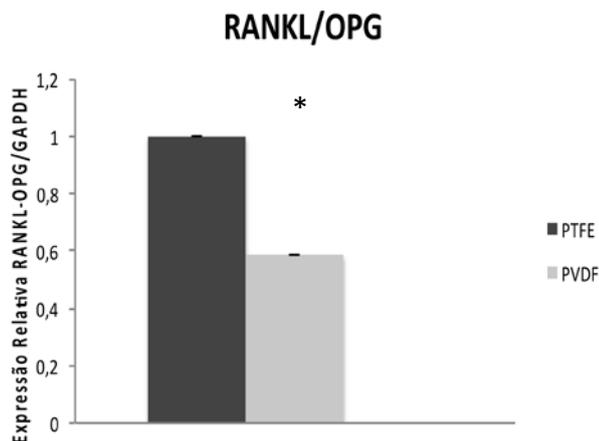


**Figura 36-** Expressão relativa de CALCR em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \* Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ )



A razão da expressão gênica entre o ligante do receptor para a ativação do fator nuclear *kappa* B (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG) foi significativamente menor no Grupo PVDF quando comparada com o Grupo PTFE (Figura 37).

**Figura 37-** Expressão relativa da razão entre RANKL e OPG em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados em calvárias de ratas e preenchidos com as membranas de PTFE e PVDF. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo (GAPDH) e são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \* Indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ )





## ***5. DISCUSSÃO***

---



## 5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram neoformação óssea em defeitos preenchidos com a membrana de PTFE e com a membrana de P(VDF-TrFE)/BT em calvárias de ratas com modelo experimental para a osteoporose.

Neste estudo foi utilizado um modelo experimental para a osteoporose bastante preconizado na literatura (FROST; JEE, 1992), pois as características da perda óssea em ratas ovariectomizadas são muito similares a das mulheres na pós-menopausa (KALU, 1991).

Por meio dos resultados histológicos e histomorfométricos obtidos neste estudo, foi possível observar a neoformação óssea utilizando os dois tipos de membranas (CRUMP et al., 1996; SALATA et al., 2001; LOPES et al., 2014). Um fato relevante é que a membrana de P(VDF-TrFE)/BT favoreceu o crescimento de novas trabéculas ósseas acima e abaixo de sua estrutura, o que não foi observado nos defeitos preenchidos com a membrana de PTFE (LOPES et al., 2014). Contudo, ao contrário de Lopes et al. (2014) não foi observada a presença de tecido conjuntivo entre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT e o tecido ósseo, sugerindo uma boa integração entre o biomaterial utilizado e o tecido ósseo (AMANO et al., 2004). Outro fato importante é a ausência de uma resposta inflamatória na presença da membrana de P(VDF-TrFE)/BT, o que não foi observado em outros estudos *in vivo* que utilizaram membranas Bio-Gide®-ALP (OORTGIESEN et al., 2012).

Para quantificar a neoformação óssea observada histologicamente, foi feita a análise morfométrica, por meio das imagens tridimensionais obtidas com a utilização de micro-CT que é de alta precisão e seguindo os parâmetros preconizados na literatura (BOUXSEIN et al., 2010). Quando comparadas as membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, ambas induziram a resultados semelhantes com relação aos parâmetros volume ósseo, superfície óssea, número de trabéculas, espessura e separação trabecular, o que demonstra que a membrana de P(VDF-TrFE)/BT foi efetiva na formação óssea.

Outros grupos de pesquisa que investigam a biocompatibilidade de materiais também observaram formação óssea significativa em ratas ovariectomizadas após a utilização de membranas de PTFE associada ao ácido zoledrônico (fármaco, inibidor da reabsorção óssea osteoclática) (MARDAS et al., 2017) e substitutos ósseos como o Bio-Oss e Biosilicato (VAN HOUDT et al., 2015). Porém o mesmo não foi observado quando utilizadas membranas colágenas de origem bovina, onde os animais ovariectomizados apresentaram volume ósseo significativamente inferior (HIRATA et al., 2015). Em nosso estudo, para os

parâmetros superfície óssea e número de trabéculas, os grupos que receberam as membranas apresentaram valores significativamente maiores que os grupos que não utilizaram membrana, demonstrando a influência positiva tanto da membrana de PTFE como a de P(VDF-TrFE)/BT em animais osteoporóticos. De acordo com Weber et al. (2010) o PVDF-TrFE apresenta citocompatibilidade e num formato tridimensional, poderia ser um material promissor capaz de influenciar no comportamento e na proliferação celular, tanto *in vivo* e como *in vitro*. Embora estes autores tenham realizado somente experimentos *in vitro*, eles sugerem que a P(VDF-TrFE)/BT é um biomaterial com alto potencial e que deveria ser investigado ser utilizado na engenharia tecidual *in vivo*. Em estudo anterior em cultura de células, Teixeira et al. (2010) demonstraram que a membrana de P(VDF-TrFE)/BT favoreceu a adesão celular, proliferação e diferenciação de fibroblastos e queratinócitos quando comparada com a membrana de PTFE. Apesar do fato de nossos resultados serem provenientes de experimento *in vivo*, futuros estudos *in vitro* poderiam elucidar se a membrana de P(VDF-TrFE)/BT também favoreceria os mesmos eventos celulares em animais osteoporóticos.

Outro importante parâmetro investigado por meio da análise microtomográfica foi a superfície óssea específica, que é a razão entre a superfície óssea e o volume ósseo (BOUXSEIN et al., 2010). Os maiores valores da superfície óssea específica no grupo que utilizou a membrana de P(VDF-TrFE)/BT estão de acordo com os resultados de Teixeira et al. (2011) que verificaram que a membrana de P(VDF-TrFE)/BT, *in vitro*, foi capaz de favorecer a diferenciação osteoblástica de células obtidas de explantes de osso alveolar.

Neste estudo, a densidade de conectividade apresentou maior valor para o grupo P(VDF-TrFE)/BT e estes foram significativos quando comparados a todos os outros grupos deste estudo. A conectividade é uma medida topológica que conta o número de objetos como por exemplo, as cavidade medulares totalmente circundadas por osso, bem como o número de conexões que devem ser quebradas para dividir a estrutura em duas partes. Esta medida deve ser dividida pelo volume total, sendo mais apropriado chamá-la densidade de conectividade (ODGARD; GUNDERSEN, 1993). Portanto, pode-se inferir que o tecido ósseo neoformado pela membrana de P(VDF-TrFE)/BT é mais resistente que aquele formado pela membrana de PTFE.

As alterações que a osteoporose pode produzir no metabolismo das células ósseas resultam da ação de um conjunto diversificado de proteínas mobilizadas como resultado da expressão diferencial de seus respectivos genes. As pesquisas genômicas procuram compreender quais são os papéis funcionais dos diferentes genes e de quais processos

biológicos eles participam em um dado tecido frente a diferentes condições fisiológicas, patológicas ou ambientais (DONATE et al., 2013). Neste estudo, foi avaliada, a partir das células presentes no defeito ósseo, a expressão gênica dos marcadores osteoblásticos RUNX2, ALP, BSP, OC, OPN, OSX, OPG e RANKL dos marcadores osteoclásticos RANK, CTSK, MMP-9 e CALCR.

Embora outros trabalhos tenham observado uma maior expressão de RUNX2, OPN, ALP, BSP e OC em células derivadas de osso alveolar cultivadas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT (TEIXEIRA et al., 2011), nossos resultados não foram concordantes, pois quando comparadas as duas membranas que foram utilizadas, verificou-se uma menor expressão de RUNX2, BSP, OPN, OSX e RANKL no grupo que recebeu a membrana de P(VDF-TrFE)/BT. Nossos resultados também não corroboram com aqueles obtidos com animais saudáveis que utilizaram os mesmos tipos de membranas em defeitos ósseos de calvárias, onde foram observadas expressões gênicas semelhantes e/ou significativamente maiores no grupo que utilizou a P(VDF-TrFE)/BT (LOPES et al., 2014). Possivelmente a menor expressão dos marcadores osteoblásticos possa ter ocorrido não devido à presença da membrana exclusivamente, mas devido às alterações sistêmicas induzidas pela osteoporose, pois a mesma influencia tanto no período inicial de reparação óssea quanto nos estágios mais avançados (KUBO et al., 1999; NAMKUNG-MATTHAI et al., 2001), interferindo na taxa de proliferação das células mesenquimais indiferenciadas e dos osteoblastos (TORRICELLI et al., 2002). Apesar disso, assim como outros autores utilizando substitutos ósseos (VAN HOUDT et al., 2015) observou-se maior expressão quantitativa de OPG, o que juntamente com a repressão de RANKL, sugere que a membrana de PVDF previne a reabsorção óssea devido a uma menor ativação local dos osteoclastos e conseqüentemente, menor taxa de remodelação óssea. Possivelmente, a atividade de reabsorção dos osteoclastos foi suprimida por altas concentrações de OPG. Além disso, a nível molecular, a OPG diminui a expressão de genes relacionados com reabsorção óssea por osteoclastos (FU et al., 2013). A razão RANKL/OPG em nosso estudo confirma a influência da membrana na modulação gênica, assim como visto no estudo de Lima et al. (2008). É importante ressaltar que a expressão gênica de ALP e OC foi semelhante nos dois grupos estudados, sugerindo que a mineralização do osso sob a membrana de P(VDF-TrFE)/BT foi semelhante àquele sob a membrana de PTFE.

Em nosso estudo, apesar de haver uma formação óssea similar positiva na presença das duas membranas avaliadas, comportamentos diferentes foram observados em relação à

modulação gênica, com maior repressão dos genes associados à formação óssea na membrana de PVDF quando comparado com a PTFE. Outros trabalhos evidenciam o efeito positivo na expressão quantitativa de genes na presença de biomateriais como o Biosilicato, sem formação óssea significativa (VAN HOUTT et al., 2015). O exato mecanismo deste efeito não é claro, mas acredita-se que esta discrepância possa estar relacionada com as propriedades inerentes dos materiais utilizados. Os resultados microtomográficos mostraram que os parâmetros de formação óssea analisados foram semelhantes possivelmente devido à presença do titanato de bário na membrana de PVDF que possui propriedades piezoelétricas. De acordo com Baxter et al. (2010) as propriedades piezoelétricas não possuem um único modo de ação, mas é provável que resulte da adsorção de proteínas, íons e outras moléculas sobre a superfície do material, influenciando no processo de osteogênese.

Nossos resultados mostraram expressões significativamente maiores de genes relacionados à reabsorção óssea, como o MMP9, CALCR na presença da membrana de P(VDF-TrFE)/BT, quando comparado à membrana de PTFE e similaridade nas expressões de RANK e CTSK. A maior expressão de CALCR pode ter contribuído para a maior quantidade de tecido ósseo encontrado por meio da análise por micro-CT nos animais que receberam a membrana de P(VDF-TrFE)/BT.

## ***6. CONCLUSÕES***

---



## 6. CONCLUSÕES

Em conclusão, a partir de todos os resultados obtidos, sugere-se que a membrana de P(VDF-TrFE)/BT possa ser utilizada como uma alternativa na regeneração tecidual guiada, sendo benéfica em condições sistêmicas de distúrbios ósseos, como a osteoporose, tornando-se uma alternativa viável dentro do campo dos biomateriais.



## ***REFERÊNCIAS***

---



## REFERÊNCIAS

- AMADEI, S. U.; SILVEIRA, V. A. S.; PEREIRA, A. C.; CARVALHO, Y. R.; ROCHA, R. F. da. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.
- AMANO, Y.; OTA, M.; SEKIGUCHI, K.; SHIBUKAWA, Y.; YAMADA, S. Evaluation of a poly-l-lactic acid membrane and membrane fixing pin for guided tissue regeneration on bone defects in dogs. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 97, n. 2, p. 155-63, 2004.
- BAXTER, F. R.; BOWEN, C. R.; TURNER, I. G.; DENT, A. C. Electrically active bioceramics: a review of interfacial responses. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 38, n. 6, p. 2079-92, 2010.
- BELOTI, M. M.; DE OLIVEIRA, P. T.; GIMENES, R.; ZAGHETE, M. A.; BERTOLINI, M. J.; ROSA, A. L. In vitro biocompatibility of a novel membrane of the composite poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 79, n. 2, p. 282-288, 2006.
- BOERCKEL, J. D.; UHRIG, B. A.; WILLETT, N. J.; HUEBSCH, N.; GULDBERG, R. E. Mechanical regulation of vascular growth and tissue regeneration in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 37, p. 674-680, 2011.
- BOUXSEIN, M. L.; BOYD, S. K.; CHRISTIANSEN, B. A.; GULDBERG, R. E.; JEPSEN, K. J.; MÜLLER, R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Jornal of Bone Mineral Research**, v. 25, n. 10, p. 1468-86, 2010.
- BOYNE, P. J. Regeneration of alveolar bone beneath cellulose acetate filter implants. **Journal of Dental Research**, v. 43, 1964.
- BOYNE, P. J. Restoration of osseous defects in maxillofacial casualties **The Journal of the American Dental Association**, v. 78, n. 4, p. 767-776, 1969.
- CRUMP, T.B.; RIVERA-HIDALGO, F.; HARRISON, J. W.; WILLIAMS, F. E.; GUO, I. Y. Influence of three membrane types on healing of bone defects. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 82, n. 4, p. 365-74, 1996.
- DANIELL, H. W. Postmenopausal tooth loss. contributions to edentulism by osteoporosis and cigarette smoking. **Archives of Internal Medicine**, v. 143, n. 9, p. 1678-1682, 1983.
- DE SOUZA, M. P. G. Diagnóstico e tratamento da osteoporse. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 45, n. 3, p. 220-229, 2010.
- DEVLIN, H.; FERGUSON, M.W. Alveolar ridge resorption and mandibular atrophy. A review of the role of local and systemic factors. **British Dental Journal**, v. 170, n. 3, p. 101-104, 1991.
- DIMITRIOU, R.; MATALIOTAKIS, G. I.; CALORI, G. M.; GIANNOUDIS, P. V. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. **BMC Medicine**, v. 10, n. 81, p. 1-24, 2012.
- DONATE, P. B.; FORNARI, T. A.; MACEDO, C.; CUNHA, T. M.; NASCIMENTO, D. C.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; DONADI, E. A.; CUNHA, F. Q.; PASSOS, G. A. T cell post-transcriptional miRNA-mRNA interaction networks identify targets associated with susceptibility/resistance to collagen-induced arthritis. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2013.

DROZDZOWSKA, B.; PLUSKIEWICZ, W.; MICHNO, M. Tooth count in elderly women in relation to their skeletal status. **Maturitas**, v. 55, n. 2, p. 126-131, 2006.

DUCHEYNE, P.; DE MEESTER, P.; AERNOUDT, E. Influence of a functional dynamic loading on bone ingrowth into surface pores of orthopedic implants. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 11, n. 6, p. 811-838, 1977.

ERDOGAN, O.; INCKI, K. K.; BENLIDAYI, M. E.; SEYDAOGLU, G.; KELEKCI, S. Dental and radiographic findings as predictors of osteoporosis in postmenopausal women. **Geriatrics & Gerontology International**, v. 9, n. 2, p. 155-164, 2009.

E SILVA, F. M. S.; GERMANO, A. R.; MOREIRA, R. W. F.; MORAIS, M. de. Membranas absorvíveis x não-absorvíveis na implantodontia: revisão da literatura. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial**, v. 5, n. 2, p. 19-24, 2005.

FROST, H. M.; JEE, W. S. On the rat model of human osteopenias and osteoporosis. **Bone and Mineral**, v. 18, n. 3, p. 227-236, 1992.

FU, Y. X.; GU, J. H.; ZHANG, Y. R.; TONG, X. S.; ZHAO, H. Y.; YUAN, Y.; LIU, X. Z.; BIAN, J. C.; LIU, Z. P. Osteoprotegerin influences the bone resorption activity of osteoclasts. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 31, n. 6, p. 1411-1417, 2013.

GALI, J. C. Osteoporose. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 3-12, 2001.

GIMENES, R.; ZAGHETE, M. A.; BERTOLINI, M.; VARELA, J. A.; COELHO, L. O.; SILVA, N. F. Composites PVDF-TrFE/BT used as bioactive membranes for enhancing bone regeneration. In: Bar-Cohen Y, org. **Proceedings of SPIE: Smart Structures and Materials**. Bellingham, WA, v. 5385, p. 539-47, 2004.

GUR, A.; NAS, K.; KAYHAN, O.; ATAY, M.B.; AKYUZ, G.; SINDAL, D.; AKŞIT, R.; ONCEL, S.; DILSEN, G.; CEVIK, R.; GUNDUZ, O.H.; ERSOY, Y.; ALTAY, Z.; OZTURK, C.; AKKUS, S.; SENOCAK, O.; KAVUNCU, V.; KIRNAP, M.; TEKEOGLU, I.; ERDOGAN, F.; SARAC, A.J.; DEMIRALP, L.; DEMIRKESEN, A.; ADAM, M. The relation between tooth loss and bone mass in postmenopausal osteoporotic women in Turkey: a multicenter study. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 21, n. 1, p. 43-47, 2003.

HECK, D. A.; NAKAJIMA, I.; KELLY, P. J.; CHAO, E. Y. The effect of load alteration on the biological and biomechanical performance of a titanium fiber-metal segmental prosthesis. **Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume**, v. 68, n.1, p. 118-126, 1986.

HIRATA, H. H.; MUNHOZ, M. A.; PLEPIS, A. M.; MARTINS, V. C.; SANTOS, G. R.; GALDEANO, E. A.; CUNHA, M. R. Feasibility study of collagen membranes derived from bovine pericardium and intestinal serosa for the repair of cranial defects in ovariectomised rats. **Injury**, v. 46, n. 7, p. 1215-22, 2015.

HOAR, W.; HICKMAN, C. P. Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. In: W Hoar & CP Hickman, editors. *General and Comparative Physiology*. 2.ed. New Jersey: Prentice-hall; p. 260-265, 1975.

HURLEY, L. A.; STINCHFIELD, F. E.; BASSETT, A. L.; LYON, W. H. The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions. **Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume**, v. 41, p. 1243-1254, 1959.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2018. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br>.

- KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone and Mineral**, v. 15, n. 3, p. 175–191, 1991.
- KUBO, T.; SHIGA, T.; HASHIMOTO, J.; YOSHIOKA, M.; HONJO, H.; URABE, M.; KITAJIMA, I.; SEMBA, I.; HIRASAWA, Y. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 68, n. 5-6, p. 197-202, 1999.
- LIMA, L. L.; GONÇALVES, P. F.; SALLUM, E. A.; CASATI, M. Z.; NOCITI, F. H. JR. Guided tissue regeneration may modulate gene expression in periodontal intrabony defects: a human study. **Journal of Periodontal Research**, v. 43, n. 4, p. 459-64, 2008.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.
- LOPES, H. B.; SANTOS, T. D.; DE OLIVEIRA, F. S.; FREITAS, G. P.; DE ALMEIDA, A. L.; GIMENES, R.; ROSA, A. L.; BELOTI, M. M. Poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate composite for in vivo support of bone formation. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 29, n. 1, p. 104-112, 2014.
- MANIATOPOULOS, C.; RODRIGUEZ, A.; DEPORTER, D. A.; MELCHER, A. H. An improved method for preparing histological sections of metallic implants. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 1, n. 1, p. 31-7, 1986.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.
- MARDAS, N.; BUSETTI, J.; DE FIGUEIREDO, J. A.; MEZZOMO, L. A.; SCARPARO, R. K.; DONOS, N. Guided bone regeneration in osteoporotic conditions following treatment with zoledronic acid. **Clinical Oral Implants Research**, v. 28, n. 3, p. 362-371, 2017.
- MOEDANO, D. E.; IRIGOYEN, M. E.; BORGES-YÁÑEZ, A.; FLORES-SÁNCHEZ, I.; ROTTER, R. C. Osteoporosis, the risk of vertebral fracture, and periodontal disease in an elderly group in Mexico City. **Gerodontology**, v. 28, n. 1, p. 19-27, 2011.
- MOHAMMAD, A. R.; BRUNSVOLD, M.; BAUER, R. The strength of association between systemic postmenopausal osteoporosis and periodontal disease. **International Journal of Prosthodontics**, v. 9, n. 5, p. 479-483, 1996.
- NAÇÕES UNIDAS (UNFPA). Envelhecimento no Século XXI: Celebração e Desafio. Nova York; Londres, p. 1-8, 2012. Disponível em: [https://www.unfpa.org/sites/default/files/pub-pdf/Portuguese-Exec-Summary\\_0.pdf](https://www.unfpa.org/sites/default/files/pub-pdf/Portuguese-Exec-Summary_0.pdf).
- NAMKUNG-MATTHAI, H.; APPLEYARD, R.; JANSEN, J.; HAO LIN, J.; MAASTRICHT, S.; SWAIN, M.; MASON, R. S.; MURRELL, G. A.; DIWAN, A.D.; DIAMOND, T. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. **Bone**, v. 28, n. 1, p. 80-6, 2001.
- NATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION. BONE BASICS 2013, p. 1-6, 2013. Disponível em: <https://www.nof.org/wp-content/uploads/2016/02/Who-Gets-Osteoporosis.pdf>.
- ODGAARD, A.; GUNDERSEN, H. J. Quantification of connectivity in cancellous bone, with special emphasis on 3-D reconstructions. **Bone**, v. 14, n. 2, p. 173-182, 1993.

OORTGIESEN, D. A.; PLACHOKOVA, A. S.; GEENEN, C.; MEIJER, G. J.; WALBOOMERS, X. F.; VAN DEN BEUCKEN, J. J.; JANSEN, J. A. Alkaline phosphatase immobilization onto Bio-Gide® and Bio-Oss® for periodontal and bone regeneration. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, n. 6, p. 546-55, 2012.

PARFITT, A. M.; DREZNER, M. K.; GLORIEUX, F. H.; KANIS, J. A.; MALLUCHE, H.; MEUNIER, P. J.; OTT, S. M.; RECKER, R. R. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 2, n. 6, p. 595-610, 1987.

PENONI, D. C.; LEÃO, A. T. T.; FERNANDAES, T. M.; TORRES, S. R. Possíveis ligações entre a osteoporose e a doença periodontal. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 3, p. 270-273, 2017.

PINTO - NETO, A. M.; SOARES, A.; URBANETZ, A.; E SOUZA, A. C. DE A.; FERRARI, A. E. M.; AMARAL, B.; MOREIRA, C.; FERNANDES, C. E.; ZERBINI, C.; BARACAT, E.; DE FREITAS, E. C.; MEIRELLES, E.; BANDEIRA, F.; GONÇALVES, H. T.; LEMGRUBER, I.; MARQUES NETO, J. F.; BORGES, J. L. C.; DE CASTRO, J. S.; FIAT, J. C.; MENDONÇA, L. M. C.; OLIVEIRA, L. RUSSO, L. A.; DE GREGÓRIO, L. H.; MARONE, M.; CASTRO, M. L.; HAIDAR, M. A.; DOS SANTOS, P. R. D.; PLAPLER, P.; CARNEIRO, R.; GUARNIERO, R.; MACHADO, R. B.; PEREIRA, R.; LEDERMAN, R.; RADOMINSKI, S.; EIS, S. R.; PEREIRA, S. R.; SZJENFELD, V.; CHAHADE, W. Consenso brasileiro de osteoporose – 2002. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 42, n. 6, p. 343-354, 2002.

RAKHMATIA, Y. D.; AYUKAWA, Y.; FURUHASHI, A.; KOYANO, K. Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. **Journal of Prosthodontic Research**, v. 57, n. 1, p. 3-14, 2013.

RAWLINSON, S. C. F.; BOYDE, A.; DAVIS, G. R.; HOWELL, P. G. T.; HUGHES, F. J.; KINGSMILL, V. J. Ovariectomy vs. hypofunction: Their effects on rat mandibular bone. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 7, p. 615-620, 2009.

RIGGS, B. L.; MELTON, L. J. 3RD. Evidence for two distinct syndromes of involuntional osteoporosis. **American Journal of Medicine**, v. 75, n. 6, p. 899-901, 1983.

RONDA, M.; REBAUDI, A.; TORELLI, L.; STACCHI, C. Expanded vs. dense polytetrafluoroethylene membranes in vertical ridge augmentation around dental implants: a prospective randomized controlled clinical trial. **Clinical Oral Implants Research**, v. 25, n. 7, p. 859-866, 2014

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning**. 3rd ed. 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SAM, G.; PILLAI, B. R. Evolution of barrier membranes in periodontal regeneration - "Are the third Generation Membranes really here?". **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 12, p. 14-17, 2014.

SALATA, L. A.; HATTON, P. V.; DEVLIN, A. J.; CRAIG, G. T.; BROOK, I. M. In vitro and in vivo evaluation of e-PTFE and alkali-cellulose membranes for guided bone regeneration. **Clinical Oral Implants Research**, v. 12, n. 1, p. 62-8, 2001.

SECRETARIA DE DIREITOS HUMANOS, 2018. Disponível em <http://www.mdh.gov.br/assuntos/pessoaidosa/dadosestatisticos/DadosobreoenvelhecimentonoBrasil.pdf>.

SICCHIERI, L. G.; CRIPPA, G. E.; DE OLIVEIRA, P. T.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Pore size regulates cell and tissue interactions with PLGA-CaP scaffolds used for bone engineering. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 6, n. 2, p. 155-162, 2012.

TEIXEIRA, L. N.; CRIPPA, G. E.; GIMENES, R.; ZAGHETE, M. A.; DE OLIVEIRA, P.T.; ROSA, A. L.; BELOTI, M. M. Response of human alveolar bone-derived cells to a novel poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene)/barium titanate membrane. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 22, n. 1, p. 151-158, 2011.

TEIXEIRA, L. N.; CRIPPA, G. E.; TRABUCO, A. C.; GIMENES, R.; ZAGHETE, M. A.; PALIOTO, D. B.; DE OLIVEIRA, P. T.; ROSA, A. L.; BELOTI, M. M. In vitro biocompatibility of poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene)/barium titanate composite using cultures of human periodontal ligament fibroblasts and keratinocytes. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 3, p. 979-989, 2010.

TEZAL, M.; WACTAWSKI-WENDE, J.; GROSSI, S. G.; HO, A. W.; DUNFORD, R.; GENCO, R. J. The relationship between bone mineral density and periodontitis in postmenopausal women, **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 9, p. 1492-1498, 2000.

TORRICELLI, P.; FINI, M.; GIAVARESI, G.; GIARDINO, R. Human osteoblast cultures from osteoporotic and healthy bone: biochemical markers and cytokine expression in basal conditions and in response to 1.25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 219-27, 2002.

VAN HOUTT, C. I.; TIM, C. R.; CROVACE, M. C.; ZANOTTO, E. D.; PEITL, O.; ULRICH, D. J.; JANSEN, J. A.; PARIZOTTO, N. A.; RENNO, A. C.; VAN DEN BEUCKEN, J. J. Bone regeneration and gene expression in bone defects under healthy and osteoporotic bone conditions using two commercially available bone graft substitutes. **Biomedical Materials**, v. 10, n. 3, 2015.

VISHWANATH, S. B.; KUMAR, V.; KUMAR, S.; SHASHIKUMAR, P.; SHASHIKUMAR, Y.; PATEL, P. V. Correlation of periodontal status and bone mineral density in postmenopausal women: a digital radiographic and quantitative ultrasound study. **Indian Journal of Dental Research**, v. 22, n. 2, p. 270-276, 2011.

WEBER, N.; LEE, Y. S.; SHANMUGASUNDARAM, S.; JAFFE, M.; ARINZEH, T. L. Characterization and in vitro cytocompatibility of piezoelectric electrospun scaffolds. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 9, p. 3550-3556, 2010.

WILTFANG, J.; MERTEN, H. A.; PETERS, J. H. Comparative study of guided bone regeneration using absorbable and permanent barrier membranes: a histologic report. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 13, n. 3, p. 416-421, 1998.

YOSHIHARA, A.; SEIDA, Y.; HANADA, N.; NAKASHIMA, K.; MIYAZAKI, H. The relationship between bone mineral density and the number of remaining teeth in community-dwelling older adults. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 32, n. 10, p. 735-740, 2005.



***ANEXOS***

---



## ANEXOS

## Anexo 1- Aprovação do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**CEUA**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o Protocolo nº 2014.1.157.58.4 sobre a pesquisa intitulada “Efeito da membrana de Poli(Vinilideno-Trifluoretileno)/Titanato de Bário no reparo de defeitos ósseos em calvárias de ratas ovariectomizadas”, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Selma Siéssere, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, foi APROVADO em reunião da CEUA de 16/04/2014 (totalizando 36 animais).

We certify that the protocol nº 2014.1.157.58.4 about the research entitled “The effect of Poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate composite in the repair of bone defects in calvaria of ovariectomized rats”, under responsibility of Profa. Dra. Selma Siéssere, is in accordance with the Ethical principles in animal research adopted by the Animal Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil was approved in 16/04/2014 (totalizing 36 animals).

Ribeirão Preto, 16 de abril de 2014.



**Profa. Dra. Andiará De Rossi Daldegan**  
Coordenadora da CEUA – FORP/USP

Anexo 2- Congresso da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

33ª REUNIÃO ANUAL  
7 a 10 de setembro de 2016 - Campinas - SP

## DECLARAÇÃO

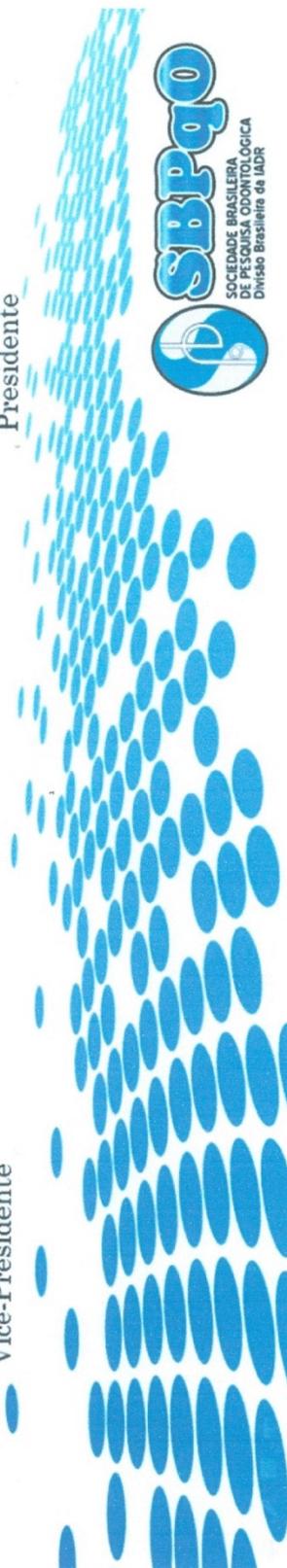
Declaramos que

**Priscilla Hakime Scalize**

participou da 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, que foi realizada no período de 7 a 10 de setembro de 2016, em Campinas – SP – Brasil.

  
Carlos Eduardo Francci  
Vice-Presidente

  
Altair Antoninha Del Bel Cury  
Presidente



# 33ª REUNIÃO ANUAL

7 a 10 de setembro de 2016 - Campinas - SP

## CERTIFICADO

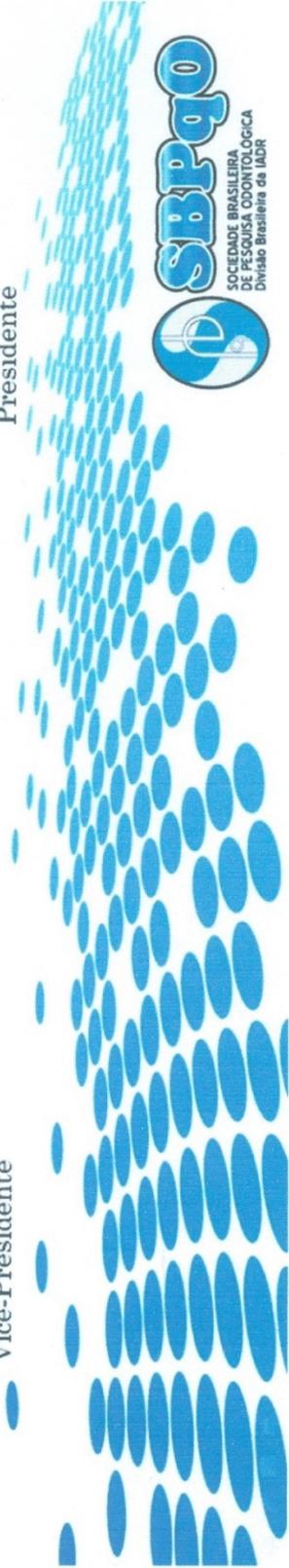
Certificamos que

o trabalho PN0702 - EFEITO DA MEMBRANA DE P(VDF-TRFE)/BT NO REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS EM RATAS OVARIETOMIZADAS de SCALIZE PH\*, SOUSA LG, ROSA AL, BELOTTI MM, GIMENES R, ALMEIDA ALG, REGALO SCH, SIÉSSERE S

foi apresentado na 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, no período de 7 a 10 de setembro de 2016, em Campinas – SP – Brasil.

*Carlos Eduardo Francisci*  
Carlos Eduardo Francisci  
Vice-Presidente

*Altair Antoninha Del Bel Cury*  
Altair Antoninha Del Bel Cury  
Presidente



**Anexo 3- Publicação do artigo desta Tese no Journal of Materials Science: Materials in Medicine além desta revista utilizar a nossa imagem histológica como sua capa**

Artigo “Poly(Vinylidene Fluoride-Trifluoroethylene)/ barium titanate membrane promotes de novo bone formation and may modulate gene expression in osteoporotic rat model” publicado no periódico Journal of Materials Science: Materials in Medicine. Sendo também a capa da revista - Volume 27, Issue 12, December 2016.



#### **Anexo 4- Aprovação de parte do Doutorado no exterior – Universidade de Surrey em Guildford – Inglaterra**



**Brasília, 16 de Março de 2017.**

Prezado(a) Candidato(a) PRISCILLA HAKIME SCALIZE,

A Capes informa que o processo para Doutorado Sanduíche no exterior foi recomendado pela Capes na análise dos documentos de inscrição.

Informamos que iniciaremos os trâmites de concessão de sua bolsa, e que caso seja necessário algum documento complementar, este será solicitado pelo sistema Linha Direta <https://linhadireta.capes.gov.br/>.

Para os candidatos com bolsa igual ou superior a 07 meses, solicitamos que acesse o sistema SCBA (<http://scba.capes.gov.br>) para fornecer seus dados de endereço para que seja enviado o cartão de débito pelo Banco BB Américas. Para os bolsistas com período igual ou inferior a 06 meses não é necessário nenhum procedimento no momento.

O envio é feito de forma antecipada para garantir o recebimento do cartão em tempo hábil. Assim, ressaltamos que é de fundamental importância o preenchimento dos dados de forma correta a fim de evitar atrasos na entrega do cartão pelo BB Americas no endereço informado. Em caso de dúvidas ou não recebimento do cartão de débito do Banco BB Américas, favor acessar o site <http://www.bbamericas.com>.

**Informação exclusiva para candidatos da modalidade Doutorado Sanduíche: Reiteramos que o período máximo de financiamento do doutorado no Brasil por agência pública de fomento é de 48 meses. A apuração do limite total da bolsa leva em consideração: o programa matriculado atualmente, os programas que porventura tenha feito anteriormente no mesmo nível doutorado e o período de doutorado sanduíche no exterior. Para os casos de adiamento ou antecipação do período inicialmente solicitado, é necessário o envio de justificativa acompanhada de nova Carta de Aceite do Orientador no Exterior, Orientador no Brasil, do Programa de Pós-graduação e novo cronograma**

Os documentos referentes às modalidades de bolsa Estágio Pós-Doutoral e Estágio Sênior foram enviadas para o seu e-mail.

Informamos que o envio antecipado não garante a implementação da bolsa que somente ocorrerá depois de atendidos todos os requisitos do Edital e suspensa qualquer bolsa concedida por agências de fomento no país.

Para que se evite transtornos ou perda de informações, solicitamos que todas as dúvidas, solicitações, envio de documentos, inclusive da w7desistência, quando for o caso, seja enviado pelo sistema on-line <https://linhadireta.capes.gov.br/>.

Atenciosamente,

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Setor Bancário Norte (SBN), Quadra 2, Bloco L, Lote 06

Edifício Capes - CEP:70.040-020 Brasília - Distrito Federal

**Atenção:** Esta mensagem foi enviada automaticamente pelo Sistema de Avaliação de Propostas e não deve ser respondida.

**Anexo 5-Trabalho apresentado: The Association for Veterinary Teaching and Research  
Work – University of Surrey (Guildford - Inglaterra)**



**AVTRW**

The Association for Veterinary  
Teaching and Research Work



<http://www.avtrw.co.uk>

**Honorary Secretary:**

Matthew Denwood BVMS PhD FHEA MRCVS  
Faculty of Health and Medical Sciences  
University of Copenhagen  
Grønnegårdsvej 8, 1870 Frederiksberg C  
Denmark  
Email: [secretary@avtrw.co.uk](mailto:secretary@avtrw.co.uk)

**Certificate of Participation**

This document certifies that:

**Priscilla Hakime Scalize (University of Surrey)**

participated in the 71st AVTRW Annual Conference, which was held on 12th-13th  
September 2017 at the School of Veterinary Medicine, University of Surrey.

The poster presentation was entitled:

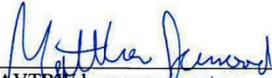
*“Stereological Analysis of the Number of Osteocytes in Bone  
Defects Performed on Wistar Ovariectomized Rats Using the Poly  
(Vinylidene-Trifluoroethylene) / Barium Titanate Membrane”*

Co-authors:

Karina Fittipaldi Bombonato Prado; Luiz Gustavo de Souza; Adalberto Luiz Rosa; Márcio Mateus Beloti; Marisa Semprini; Rossano Gimenes; Adriana Luisa Gonçalves de Almeida; Fabíola Singaretti de Oliveira; Milla Sprone Tavares; Roger Rodrigo Fernandes; Sebastião Carlos Bianco; Simone Cecílio Hallak Regalo; Antonio Augusto Coppi; and Selma Siessere

Priscilla also helped in the organisation of the event.

Signed by the honorary secretary on behalf of the AVTRW

  
AVTRW honorary secretary

2018-02-12  
Date

**Veterinary Record**

Be the first to read  
the latest research



 Sign up for  
email alerts ▶

**BVAQ**  
The Veterinary Association

The 2017 AVTRW conference was kindly sponsored by  
the online MSc in Veterinary Epidemiology at the University  
of Edinburgh:

<http://www.ed.ac.uk/vet/studying/postgraduate/taught-programmes/veterinary-epidemiology>

This new online MSc in Veterinary Epidemiology uses a  
systems approach to learn about the fundamental drivers of  
disease dynamics and patterns of infection seen in animal  
host communities.