UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

HELENA BACHA LOPES

**EFEITO DA MEMBRANA DE POLI(VINILIDENO-TRIFLUORETILENO)/TITANATO
DE BÁRIO SOBRE A FORMAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITOS CRIADOS EM
CALVÁRIAS DE RATOS**

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

HELENA BACHA LOPES

**EFEITO DA MEMBRANA DE POLI(VINILIDENO-TRIFLUORETILENO)/TITANATO
DE BÁRIO SOBRE A FORMAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITOS CRIADOS EM
CALVÁRIAS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia
(Periodontia), área de Cirurgia Buco-Maxilo-
Facial da Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
como requisito para a obtenção do título de
Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial

Orientador: Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

Ribeirão Preto

2014

Autorizo a reprodução e a divulgação 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

Lopes, Helena Bacha

Efeito da Membrana de Poli(Vinilideno-Trifluoretileno)/Titanato de Bário sobre a Formação Óssea em Defeitos Criados em Calvárias de Ratos. Ribeirão Preto, 2014.

54p. : il. ; 30cm

Dissertação apresentada ao Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Beloti, Márcio Mateus

1. Tecido ósseo 2. Membrana 3. MicroRNA 4. Biomaterial

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lopes, Helena Bacha

Efeito da Membrana de Poli(Vinilideno-Trifluoretileno)/Titanato de Bário sobre a Formação Óssea em Defeitos Criados em Calvárias de Ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia), área de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovada em ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**Trabalho realizado nos Laboratório de
Histologia e LAB 3D BIO do Departamento
de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial e
Periodontia da Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto – USP, com auxílio
financeiro da Fundação de Amparo à
Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP)**

*À minha Família,
por todo apoio até aqui.
Ao Gileade, com amor.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Dr. Márcio Mateus Beloti, a quem admiro muito e devo mais que um obrigado, pois sempre esteve disposto a me ajudar e possibilitar meu amadurecimento em pesquisa. Sei que seu papel foi muito além de me orientar durante esse mestrado, sou eternamente grata.

Ao Professor Dr. Mohammad Q. Hassan e à University of Alabama, Birmingham, que me receberam de forma tão prestativa por 6 meses. O Professor Hassan me mostrou a paixão em ensinar e se tornou, além de um amigo, uma grande referência para mim.

Aos Professores de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da FORP/USP: Adalberto Luiz Rosa, Valdemar Mallet da Rocha Barros, Luiz Antonio Salata, Cássio Edvard Sverzut, Samuel Porfírio Xavier, Alexandre Elias Trivellato, que desde a minha graduação sempre olhei com admiração e exemplos a serem seguidos. Só tenho a agradecer por terem me despertado a paixão pela cirurgia.

Ao Professor Paulo Tambasco de Oliveira, que nunca deixou de me responder uma pergunta.

Aos queridos funcionários da FORP/USP, em especial Dulce, Tatiana, Bel, Mary, Adriana, Sebastião, Aline e Serginho, que sempre me ajudaram no que podiam.

Aos amigos que criei durante a rotina de laboratório: Roger, Fabíola, Milla, Larissa, Lucas, Rodrigo, Thiago, Kato, Manu, Renan, Antônio, entre muitos outros que me ensinaram e estavam sempre dispostos a me ajudar.

Aos meus amigos do curso de Mestrado em Cirurgia da FORP/USP: Rafael, Felipe, Marcos, Eduardo e Evandro. Vocês, além de terem me ensinado muito sobre cirurgia, com certeza fizeram o meu mestrado muito mais divertido.

Às minhas amigas, Maria Paula, Débora, Brenda, Sibila e meu querido amigo Lourenço que, sem dúvida nenhuma, são pessoas que eu quero sempre ter por perto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro durante a realização desse projeto.

À FORP/USP por me receber mais uma vez de forma tão acolhedora e proporcionar uma excelente infraestrutura para minha pós-graduação.

Aos meus pais, por me apoiarem em todas as minhas escolhas.

À minha avó, por servir de exemplo para mim.

Às minhas irmãs, Maíra e Isadora, meus amores.

Ao Gileade, que entrou no mestrado sendo um parceiro de cirurgia e um bom amigo e agora termina comigo essa fase sendo meu amor. Muito obrigada por fazer dessa uma das melhores fases da minha vida.

*“O futuro pertence àqueles que
acreditam na beleza de seus sonhos.”*

Eleanor Roosevelt

RESUMO

Efeito da Membrana de Poli(Vinilideno-Trifluoretileno)/Titanato de Bário sobre a Formação Óssea em Defeitos Criados em Calvárias de Ratos LOPES, HB. Dissertação (Mestrado). Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2014. 54f.

Os princípios biológicos da regeneração óssea guiada (ROG) têm contribuído para o desenvolvimento de membranas que, em odontologia, são utilizadas em diversas situações como tratamentos com implantes dentários, aumento de rebordo alveolar e reparo de defeitos ósseos de origem traumática e patológica. Resultados de experimentos in vitro comparando a membrana obtida pela associação do polímero poli(fluoreto de vinilideno-trifluoretileno) e da cerâmica titanato de bário (P(VDF-TrFE)/BT) à membrana de politetrafluoretileno (PTFE) mostraram uma resposta favorável de osteoblastos, fibroblastos e queratinócitos à membrana de P(VDF-TrFE)/BT. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da membrana de P(VDF-TrFE)/BT sobre a formação óssea in vivo. Foram criados defeitos ósseos com 5 mm de diâmetro em calvárias de ratos machos Wistar (peso 200-250 g), distribuídos em três grupos com relação à utilização ou não de membranas nos defeitos ósseos: (1) membrana de P(VDF-TrFE)/BT; (2) membrana de PTFE; (3) nenhum tipo de membrana. Ao final de 4 e 8 semanas os animais foram eutanasiados e as amostras foram submetidas à: (1) análise por microtomografia computadorizada (micro-CT) para avaliar volume ósseo, superfície óssea, superfície óssea específica, número de trabéculas, separação trabecular e espessura trabecular, (2) análise histológica com base em cortes histológicos não descalcificados, (3) análise por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) para avaliar a expressão gênica dos marcadores ósseos runt-related transcription factor 2 (RUNX2), fosfatase alcalina (ALP), sialoproteína óssea (BSP), osteocalcina (OC), osteoprotegerina (OPG) e receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) e (4) análise da expressão de microRNAs (miRs) pela técnica de sequenciamento na plataforma Illumina. Os dados das análises morfológicas e da expressão gênica foram submetidos ao teste de Kruskal–Wallis, seguido pelo teste de Fischer quando apropriado, e para a análise

da expressão de miRs foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparar a membrana de P(VDF-TrFE)/BT à de PTFE. Para todas as comparações o nível de significância adotado foi de 0,05. Os defeitos que não receberam a membrana tiveram uma formação óssea insignificante. Ambas as membranas favoreceram a formação óssea, sendo a superfície óssea maior sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT comparada à de PTFE em 4 ($p=0,01$) e 8 ($p=0,001$) semanas e a separação trabecular maior sobre a membrana de PTFE comparada à de P(VDF-TrFE)/BT em 4 ($p=0,05$) e 8 ($p=0,001$) semanas. A expressão gênica de BSP ($p=0,01$), OC ($p=0,001$) e OPG ($p=0,001$) foi maior e de RANKL ($p=0,001$) foi menor sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT comparada à de PTFE em 4 semanas. A expressão gênica de RUNX2 ($p=0,001$) e OC ($p=0,05$) foi maior e de ALP ($p=0,05$), RANKL ($p=0,01$) e OPG ($p=0,001$) foi menor sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT comparada à de PTFE em 8 semanas. Quarenta e cinco e 13 miRs foram regulados positivamente (>2 vezes) em 4 semanas e 8 semanas, respectivamente, e 11 e 39 miRs foram regulados negativamente (>2 vezes) em 4 semanas e 8 semanas, respectivamente, pela membrana de P(VDF-TrFE)/BT comparada à de PTFE. Os resultados indicam que a membrana de P(VDF-TrFE)/BT favorece a formação óssea quando comparada à membrana de PTFE e, portanto, pode ser considerada um biomaterial promissor para ser utilizado em procedimentos de ROG.

Palavras-chave: Tecido ósseo, Membrana, MicroRNA, Biomaterial.

ABSTRACT

Effect of Poly(vinylidene-trifluoroethylene)/Barium Titanate Membrane on Bone Formation in Rat Calvaria Defects. LOPES, HB. Thesis (Master's Degree). Ribeirão Preto: School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2014. 54f.

Biological principles of guided bone regeneration (GBR) have contributed to development of membranes that, in dentistry, are used in several situations such as treatment with dental implants, alveolar bone augmentation and repair of traumatic and pathological bone defects. Results of in vitro experiments comparing membrane obtained by the combination of poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene) and barium titanate ceramics (P(VDF-TrFE)/BT) with polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane showed a favorable response of osteoblasts, fibroblasts and keratinocytes to the P(VDF-TrFE)/BT membrane. The aim of this study was to evaluate the effect of P(VDF-TrFE)/BT membrane on in vivo bone formation. Bone defects with 5 mm in diameter were created in calvaria of male Wistar rats (weight 200-250 g), distributed into three groups regarding the use or not of membranes on defects: (1) P(VDF-TrFE)/BT membrane; (2) PTFE membrane; (3) no membrane. At the end of 4 and 8 weeks, the animals were euthanized and samples were subjected to: (1) computed microtomography analysis (micro-CT) to assess bone volume, bone surface, specific bone surface, trabecular number, trabecular thickness and trabecular separation; (2) histological analysis based on non-decalcified histological sections; (3) real time polymerase chain reaction (real time PCR) to evaluate gene expression of the bone markers runt-related transcription factor 2 (RUNX2), alkaline phosphatase (ALP), bone sialoprotein (BSP), osteocalcin (OC), osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL); (4) microRNAs (miRs) sequencing analysis at Illumina platform. Data from morphometric and gene expression analyses were submitted to the Kruskal-Wallis test followed by Fischer's test, when appropriate, and from miRs expression to the Mann-Whitney test to compare P(VDF-TrFE)/BT with PTFE membrane. For all comparisons, the significance level was 0.05. Defects without membrane exhibit a non significant bone formation. Both membranes favored

osteogenesis with an increased bone formation on the P(VDF-TrFE)/BT membrane compared with PTFE at 4 ($p=0.05$) and 8 weeks ($p=0.001$). Trabecular separation was greater on PTFE membrane compared with the P(VDF-TrFE)/BT at 4 ($p=0.05$) and 8 weeks ($p=0.001$). At 4 weeks, the gene expression of BSP ($p=0.01$), OC ($p=0.001$) and OPG ($p=0.001$) were higher on P(VDF-TrFE)/BT membrane compared with PTFE, while RANKL ($p=0.001$) was lower. The gene expression of RUNX2 ($p=0.001$) and OC ($p=0.05$) were higher and ALP ($p=0.05$), RANKL ($p=0.01$) and OPG ($p=0.001$) were lower on the membrane of P(VDF-TrFE)/BT compared with PTFE at 8 weeks. Forty-five and 13 miRs were up-regulated (> 2 fold) at 4 weeks and 8 weeks, respectively, and 11 and 39 miRs were negatively regulated (> 2 fold) at 4 weeks and 8 weeks, respectively, on the P(VDF-TrFE)/BT membrane compared with PTFE membrane. The results indicate that the P(VDF-TrFE)/BT membrane favors bone formation compared with PTFE membrane and, therefore, may be considered a promising biomaterial for using in GBR procedures.

Keywords: Bone tissue, Membrane, MicroRNA, Biomaterial.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de animais por tratamento, tempo experimental e análise realizada.....22

Tabela 2. Sequência de primers para as reações de PCR em tempo real.....26

Tabela 3. Sequência de primers para as reações de PCR em tempo real (miRs).....29

Tabela 4. Expressão de miRs regulados positivamente (>2 vezes) pela membrana de P(VDF-TrFE)/BT comparada à de PTFE em 4 e 8 semanas.....38

Tabela 5. Expressão de miRs regulados negativamente (>2 vezes) pela membrana de P(VDF-TrFE)/BT comparada à de PTFE em 4 e 8 semanas.....39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagens tridimensionais dos defeitos criados nas calvárias de ratos que não receberam membrana (controle - A, D, G, J) e que foram implantados com membrana de PTFE (B, E, H, K) ou de P(VDFTrFE)/BT (C, F, I, L) em 4 (A-F) e 8 semanas (G-L). Foi observada uma formação óssea insignificante nos defeitos que não receberam membranas em 4 e 8 semanas (A, D, G, J) e tecido ósseo formado em ambas as membranas em 4 semanas (B, C, E, F) e 8 semanas (H, I, K, L). Barra de escala: 2 mm.....31

Figura 2. Parâmetros morfométricos, volume ósseo (A), superfície óssea (B), superfície óssea específica (C), número de trabéculas (D), espessura trabecular (E) e separação trabecular (F) do tecido ósseo formado nos defeitos criados nas calvárias de ratos e implantados com membrana de PTFE ou de P(VDFTrFE)/BT em 4 e 8 semanas, avaliados por micro-CT. * Indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).32

Figura 3. Microscopia de luz dos defeitos criados nas calvárias de ratos que não receberam membrana (controle - A, D, G, J) e que foram implantados com membrana de PTFE (B, E, H, K) ou de P(VDFTrFE)/BT (C, F, I, L) em 4 (A-F) e 8 semanas (G-L). Foi observada a formação de tecido conjuntivo nos defeitos sem membrana em 4 e 8 semanas (A, D, G, J). A cabeça de seta indica a interface entre o tecido ósseo e o tecido conjuntivo (J). O tecido ósseo mineralizado recém-formado foi observado em ambos os lados das membranas em 4 (B, C) e 8 semanas (H, I). As setas indicam o íntimo contato entre o tecido ósseo e a membrana de PTFE (K) e uma camada de tecido conjuntivo entre o tecido ósseo e membrana de P(VDF-TrFE)/BT (L). Coloração: vermelho de Alizarina e azul de Stevenel. Barra de escala: A-C e G-I = 2 mm; D-F e J-L = 200 μ m.....34

Figura 4. Expressão gênica de Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) (A), fosfatase alcalina (ALP) (B), sialoproteína óssea (BSP) (C), osteocalcina (OC) (D), receptor activator of nuclear fator-kappa B ligand (RANKL) (E) e osteoprotegerina (OPG) (F) em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados nas calvárias de ratos e implantados com membrana de PTFE ou de P(VDFTrFE)/BT em 4 e 8 semanas. A expressão gênica foi normalizada por β -actina e em relação à membrana de PTFE. * Indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).....36

Figura 5: Expressão de miR-146a-5p (A), -146b-5p (C) e -133a-3p (E) em 4 semanas e de miR-29b-3p (B), -34a-5p (D) e -10a-5p (F) em 8 semanas, em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados nas calvárias de ratos e implantados com membrana de PTFE ou de P(VDFTrFE)/BT. A expressão dos miRs foi normalizada

por U6 e em relação à membrana de PTFE. * Indica diferença estatisticamente
significante ($p \leq 0,05$).....41

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRATC	12
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVO.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Membranas	22
3.2 Animais	22
3.3 Procedimento cirúrgico	23
3.4 Análise morfométrica por microtomografia computadorizada (micro-CT)	24
3.5 Análise histológica por microscopia de luz.....	24
3.6 Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real)	25
3.7 Análise da expressão em larga escala de microRNAs (miRs)	27
3.8. Validação do sequenciamento de miRs por PCR em tempo real.....	29
3.9 Análise estatística	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Análise morfométrica por micro-CT.....	30
4.2 Análise histológica por microscopia de luz.....	33
4.3 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real.....	34
4.4 Análise da expressão em larga escala de miRs.....	37
4.5 Validação do sequenciamento de miRs por PCR em tempo real	40
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1. INTRODUÇÃO

A técnica de regeneração óssea guiada (ROG) tem sido extensivamente usada no campo da periodontia e da cirurgia buco-maxilo-facial, com o objetivo de obter regeneração vertical da crista alveolar ao redor de implantes dentários, promover o aumento do rebordo alveolar e reparar defeitos ósseos traumáticos e patológicos (Pontoriero *et al.*, 1987; Nart *et al.*, 2007; Matsumoto *et al.*, 2012; Ronda *et al.*, 2013a). Esta terapia baseia-se no fato de que diferentes tecidos apresentam taxas distintas de proliferação e migração celular e que o uso de uma membrana como barreira impede os tecidos epitelial e conjuntivo de crescerem para dentro do defeito ósseo, permitindo que as células com potencial osteogênico possam preencher e regenerar o local (Dahlin *et al.*, 1988). Considerando as aplicações na ROG, as membranas devem preencher requisitos básicos como biocompatibilidade, oclusividade, integração tecidual, capacidade de manutenção do espaço, fácil manuseio, além de não afetar os tecidos circundantes, os tecidos neoformados e a saúde do paciente (Oh *et al.*, 2003).

As membranas utilizadas para a ROG são classificadas em absorvíveis e não absorvíveis. As absorvíveis podem ser compostas por colágeno (Blumenthal, 1993), polímeros de poligalactina (Caton *et al.*, 1994), polímeros de ácidos polilácticos (Laurell *et al.*, 1994; Polson *et al.*, 1995) e polímeros de ácidos poliglicólicos (Mattson *et al.*, 1999). As não absorvíveis são comumente constituídas de politetrafluoretileno (PTFE) expandido (Caffesse *et al.*, 1990), PTFE denso (Macedo *et al.*, 1995) e celulose (Novaes *et al.*, 1995; Dos Anjos *et al.*, 1998). Diversos trabalhos relatam que a ROG com a utilização de membranas absorvíveis ou não absorvíveis apresenta resultados satisfatórios com índices semelhantes de sucesso (Jung *et al.*, 2013; Van Leeuwen *et al.*, 2012).

O PTFE é um polímero constituído por uma cadeia molecular formada por ligações carbono-carbono e carbono-flúor (Karring *et al.*, 1993; Laurell e Gottlow, 1998; Gentile *et al.*, 2011; Ronda *et al.*, 2013a). Por ser quimicamente estável e biologicamente inerte, a membrana de PTFE apresenta resistência à degradação enzimática e microbiológica e não estimula reações imunológicas (Hammerle e Jung, 2003; Ronda *et al.*, 2013b). A membrana PTFE expandido é composta por duas

porções distintas: uma parte com microestruturas abertas (porosidade de 100-300 μm) e uma parte oclusiva (porosidade $< 8 \mu\text{m}$). A porção porosa promove uma neoformação de fibras de colágeno em sua superfície, aumentando a estabilidade da membrana, e permite a difusão de nutrientes através dos poros. A porção oclusiva é relativamente impermeável a líquidos e bloqueia completamente a migração de células dos tecidos moles para a área de crescimento ósseo (Ronda *et al.*, 2013). O PTFE denso é menos poroso que o PTFE expandido, porém seu uso clínico também é consagrado na literatura. O uso de PTFE expandido apresenta resultados clínicos semelhantes ao PTFE denso, no tratamento de defeitos ósseos verticais ao redor de implantes, sendo o PTFE denso mais fácil de ser removido (Ronda *et al.*, 2013). Nesse contexto, as membranas de PTFE são consideradas o “padrão ouro” entre as membranas não absorvíveis utilizadas em procedimentos de ROG e diversos estudos têm ratificado a eficácia desse biomaterial (Bartee e Carr, 1995; Linde e Hedner, 1995; Van Leeuwen *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2013; Ronda *et al.*, 2013a).

Apesar de as membranas comercialmente disponíveis apresentarem resultados satisfatórios, o desenvolvimento de novos biomateriais é de grande importância nesse campo de pesquisa. A associação de polímeros e materiais cerâmicos pode gerar novos biomateriais com potencial para regenerar o tecido ósseo pela combinação de características vantajosas como tenacidade, flexibilidade, fácil capacidade de processamento dos polímeros e fortes respostas piezoelétricas das cerâmicas (Dias e Das-Gupta, 1994). Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram que o compósito produzido pela combinação do polímero poli(fluoreto de vinilideno-trifluoretileno) e da cerâmica titanato de bário (P(VDF-TrFE)/BT) aumenta adesão, proliferação e expressão gênica dos marcadores fibroblásticos periostin, periodontal ligament specific 17, calcium-binding protein e fibromodulina em culturas de células derivadas de fragmentos do ligamento periodontal humano (Teixeira *et al.*, 2010). Além disso, notou-se que a membrana de P(VDF-TrFE)/BT favorece o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico quando comparada à membrana de PTFE, em culturas de células derivadas de osso alveolar humano, comprovado pela maior atividade de fosfatase alcalina (ALP), mineralização da matriz extracelular e expressão de genes marcadores do tecido ósseo como o runt-

related transcription factor 2 (RUNX2), sialoproteína óssea (BSP) e osteocalcina (OC) (Gimenes *et al.*, 2004; Beloti *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2011).

O desenvolvimento do tecido ósseo é um processo dinâmico que envolve uma complexa sequência de eventos regulados por vias de sinalização intracelulares (Gamez *et al.*, 2014). Pesquisas recentes mostraram que a osteogênese pode ser regulada por mecanismos pós-transcricionais como a expressão temporária de microRNAs (miRs) (Hassan *et al.*, 2012; Lian *et al.*, 2012; Eguchi *et al.*, 2013). Os miRs estão envolvidos em quase todos os processos biológicos, incluindo desenvolvimento embrionário, crescimento, diferenciação e morte celular e controle metabólico, além de regularem a diferenciação osteoblástica *in vitro* e a formação óssea *in vivo* (Hassan *et al.*, 2010; Hassan *et al.*, 2012; Vimalraj e Selvamurugan, 2012). MiRs são pequenos RNAs funcionais, com aproximadamente 22 nucleotídeos, que não codificam proteínas e regulam o processo de tradução em organismos superiores e participam da degradação de moléculas-alvo de RNA mensageiro (RNAm) (Bartel, 2004; Pawlicki e Steitz, 2010; Griffiths-Jones *et al.*, 2011; Gamez *et al.*, 2014). Os miRs primeiramente são transcritos como parte de longos precursores (transcrito primário; pri-miR) e processados no núcleo por uma RNase III (Drosha) em produtos intermediários menores (pré-miRs). Os pré-miRs são transportados para o citoplasma pela exportina 5, onde são processados por uma segunda enzima da família RNase III (Dicer), gerando miRs com 20-25 nucleotídeos. Depois de completamente processados, os miRs são incorporados ao complexo silenciador induzido por RNA por se ligarem a proteínas argonautas. Esse complexo é capaz de mediar a interação dos miRs com seu RNAm alvo, alterando a estabilidade do RNAm e inibindo o processo de tradução e, consequentemente, a expressão proteica (Vimalraj e Selvamurugan, 2012; Gamez *et al.*, 2014)

A literatura é ainda incipiente acerca da possível relação entre as características dos biomateriais e a expressão de miRs no tecido ósseo. Um estudo recente realizado por nosso grupo de pesquisa mostrou que o titânio com nanotopografia inibe a expressão dos miRs-4448, -4708 e -4773 e, consequentemente atenua a degradação de SMAD1 e SMAD4, o que intensifica a transdução de sinal da BMP-2 e induz a diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea humana (Kato *et al.*, 2014). No entanto, a

expressão de miRs em células do tecido ósseo formado em contato com membranas utilizadas em ROG não foi avaliada até o presente momento. Neste contexto, a análise e a comparação da expressão de miRs em células do tecido ósseo formado em contato com as membranas de P(VDF-TrFE)/BT e PTFE podem contribuir para o entendimento dos mecanismos intracelulares envolvidos na interação entre tecido ósseo e biomaterial e, conseqüentemente, com o desenvolvimento de novas estratégias que favoreçam os eventos relacionados ao processo de reparo ósseo.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da membrana de P(VDF-TrFE)/BT, comparada à membrana de PTFE, sobre a formação óssea em defeitos criados em calvárias de ratos por meio de parâmetros morfométricos e histológicos e da expressão de genes marcadores do fenótipo osteoblástico e de miRs.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Membranas

As membranas de P(VDF-TrFE)/BT utilizadas nesse estudo foram preparadas pelo pesquisador Rossano Gimenes conforme descrito previamente (Gimenes *et al.*, 2004). Membranas de PTFE denso (Bionnovation, Bauru, SP, Brasil) disponíveis comercialmente, foram utilizadas como controle. Todas as membranas foram cortadas na forma de discos com 6 mm de diâmetro e esterilizadas em autoclave a 134°C antes de serem utilizadas nos experimentos *in vivo*.

3.2 Animais

Foram utilizados 42 ratos machos Wistar, pesando entre 200 e 250 g, seguindo as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do campus da USP de Ribeirão Preto (11.1.890.53.0). Os animais foram distribuídos em três grupos de acordo com a utilização ou não de membranas nos defeitos ósseos criados: (1) membrana de P(VDF-TrFE)/BT; (2) membrana de PTFE; (3) nenhum tipo de membrana (controle). A distribuição dos animais, de acordo com o tipo de tratamento, tempo experimental e ensaios realizados é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Número de animais por tratamento, tempo experimental e análise realizada				
Tratamento	4 Semanas		8 Semanas	
	Histologia e morfometria	Expressão gênica e de miRs	Histologia e morfometria	Expressão gênica e de miRs
P(VDF-TrFE)/BT	5	3	5	3
PTFE	5	3	5	3
Defeito vazio	5	-	5	-

Como a neoformação óssea em defeitos não tratados é considerada insignificante (Sicchieri *et al.*, 2012), a análise da expressão gênica não foi realizada nessas amostras.

3.3 Procedimento cirúrgico

Os animais foram submetidos à cirurgia para criação de defeitos ósseos na calvária com diâmetro de 5 mm. Para isso, eles foram anestesiados com solução de Ketamina (7 mg/100 g peso corporal) (Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brasil) e Xilazina (0,6 mg/100 g peso corporal) (Dopaser Calier, Juatuba, MG, Brasil) administrada por via intramuscular. Após tricotomia e antisepsia com povidine-iodo (Rioquímica®, São José do Rio Preto, SP, Brasil) na região dorsal da cabeça, a pele e o tecido subcutâneo foram incisados ao longo da sutura sagital para expor os ossos parietais. O perióstio dos ossos parietais foi incisado e descolado e o defeito foi produzido unilateralmente utilizando uma broca trefina (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil, essa empre) com 5 mm de diâmetro sob irrigação abundante com soro fisiológico 0,9%. A opção pelo defeito unilateral e não bilateral tem como objetivos minimizar o trauma na calvária e evitar a possível interferência do tratamento no defeito contralateral, conforme descrito previamente (Gomes e Fernandes, 2011). Após receberem o tratamento com membrana de P(VDF-TrFE)/BT, PTFE ou nenhum biomaterial, a pele foi suturada com mononylon 3.0 Ethilon® (Johnson company, Waseca, MN, EUA) e a ferida cirúrgica, limpa com solução de povidine-iodo (Rioquímica®).

Ao final do procedimento cirúrgico os animais receberam dose única de analgésico Flunixinameglumina (10 mg/100 g peso corporal) (Banamine, Schering-Plough, Memphis, TN, EUA) e dose única de uma solução de antibióticos contendo Benzilpenicilina benzatina (156.000 UI/100 g peso corporal), Benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100 g peso corporal), Benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100 g peso corporal), Diidroestreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) e Estreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) (Pentabiótico, Fort Dodge, São Paulo, SP, Brasil). Ao final de 4 e 8 semanas, os animais foram eutanasiados com dose excessiva de Ketamina (15 mg/100 g peso corporal) (Agener União) e Xilazina (1 mg/100 g peso corporal) (Dopaser Calier) e as calvárias contendo os defeitos foram removidas.

3.4 Análise morfométrica por microtomografia computadorizada (micro-CT)

Para as análises morfométrica e histológica as calvárias foram removidas por meio de osteotomia realizada com discos de diamante (KG Sorensen), sob irrigação abundante com soro fisiológico 0,9%, com uma margem de aproximadamente 5 mm de distância de cada lado da área onde foi realizada a implantação da membrana. As peças foram mantidas em formol tamponado 4% (pH=7) por 48 horas e transferidas para uma solução de etanol 70% onde permaneceram por 3 dias. A análise morfométrica por micro-CT foi realizada no aparelho SkyScan 1172 (SkyScan Ltda., Antuérpia, Bélgica), operando com fonte de raios-X de 50 kV detectados por uma câmera de 11 megapixels com resolução de até 1 µm. Após aquisição e reconstrução tridimensional das imagens, foi determinado o volume de interesse de 5,0 mm de diâmetro e 2,0 mm de altura, correspondente ao local do defeito criado previamente. Foi então adotado o “threshold”, variando entre 30 e 120 dentro de uma escala de cinza (0-255), para avaliação do tecido ósseo presente no volume de interesse. Os dados foram obtidos por meio de um software de aquisição de imagens do próprio equipamento e as reconstruções foram feitas pelo software Nrecon Cluster (SkyScan Ltda.). Os programas DataViewer® versão 1.4.1 (SkyScan Ltda.) e CT Analyser® versão 1.11.8.0 (SkyScan Ltda.) foram utilizados para as análises. A partir das reconstruções obtidas, foram avaliados os parâmetros volume ósseo, superfície óssea, superfície óssea específica, espessura trabecular, número de trabéculas e separação trabecular.

3.5 Análise histológica por microscopia de luz

Após a análise por micro-CT, as amostras foram processadas para o preparo das lâminas histológicas. As peças foram desidratadas em uma série crescente de álcoois (70%, 80%, 95% e 100%) e incluídas em resina acrílica (LR White® Hard Grade, Londres, Inglaterra). O processo de impregnação em resina acrílica envolveu a colocação das peças no vácuo e agitação de 2 horas por dia, por 15 dias, substituindo a resina acrílica a cada 2 dias. Após o processo de impregnação, as peças foram

colocadas em estufa a 60°C por 12 horas para a polimerização dos blocos. Os blocos de resina acrílica foram cortados em um micrótomo de precisão (Exakt®, Apparatebau, Alemanha) e polidos com sistema de polimento (Exakt®). A face polida foi colada a uma lâmina de vidro e o bloco novamente cortado, deixando aderido à lâmina um corte com espessura aproximada de 40 µm, que foi desgastado e polido até apresentar aproximadamente 20 µm de espessura. Essa face foi submetida à coloração utilizando os corantes vermelho de Alizarina e azul de Stevenel e analisada por microscopia de luz (Maniatopoulos *et al.*, 1986).

3.6 Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real)

Para a análise da expressão gênica e de miRs o tecido ósseo neoformado, juntamente com a membrana, foram removidos com o uso de uma broca trefina (KG Sorensen) de 6 mm de diâmetro, sob irrigação abundante com soro fisiológico 0,9%. Após a remoção, as amostras foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) 1X, colocadas em tubo de 1,5 ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com 1 ml de Trizol (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) e mantidas a -20°C.

Os primers utilizados nas reações de PCR em tempo real (Tabela 2) foram desenhados utilizando o programa Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e sintetizados pela Invitrogen (Invitrogen-Life Technologies, Grand Island, NY, EUA).

Tabela 2. Sequência de primers para as reações de PCR em tempo real

Gene	Sequência sense
	Sequência anti-sense
RUNX2	CACAAACAACCACAGAACCAC
	TTGCTGTCCTCCTGGAGAAA
ALP	CCAACTCATTTGTGCCAGAG
	CAGGGCATTTCCTCAAGGTCTC
OC	GCAGACACCATGAGGACCCT
	CCGGAGTCTATTCACACCTTACTG
BSP	CTACTTTTATCCTCCTCTGAAACGGTT
	GCTAGCGGTTACCCCTGAGA
OPG	CCAGAGGACCACAATGAACAAGT
	CAAGGGACACACAGTGTCTTCC
RANKL	CAGCCTTTTGCTCATCTCACT
	TTATGGGAACCAGATGGGAT
β -Actina	AAATGCTTCTAGGCGGACTG
	GTTTTGTCAAAGAAAGGGTG

Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), fosfatase alcalina (ALP), osteocalcina (OC), sialoproteína óssea (BSP) osteoprotegerina (OPG), receptor activator of nuclear fator-kappa B ligand (RANKL) e β -actina

Cada amostra de RNA total foi obtida de fragmentos ósseos coletados de três animais. As amostras foram trituradas e tratadas com DNase (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para cada 1 ml da suspensão foram adicionados 200 μ l de clorofórmio (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e os tubos centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. A partir dessa etapa as extrações foram realizadas utilizando-se o kit SV Total RNA Isolation System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foram adicionados à suspensão, 250 μ l de álcool 95% e transferidos para um sistema de coluna de afinidade para RNA. Após lavagens com tampão e o tratamento da membrana da coluna com DNase, o RNA foi eluído em 25 μ l de água RNase-free. Para a quantificação das amostras de RNA total, uma alíquota de 3 μ l foi diluída em 297 μ l de água previamente tratada com DEPC e analisada por espectrofotometria no aparelho NanoVue (GE Healthcare, Waukesha, WI, EUA). A leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm, 230 nm e 320 nm, para obtenção da concentração de RNA/ μ l e contaminação por fenol ou proteínas. Para o preparo da água adicionou-se 1 ml de DEPC em 999 ml de água deionizada, sendo essa mistura incubada por 24 horas e autoclavada a 134°C. A fita do DNA complementar (DNAC) foi confeccionada a partir de 1 μ g de RNA

total, por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit SuperScript™ III First Strand Synthesis Systems (Invitrogen-Life Technologies) e o termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf). Para as reações de PCR em tempo real, foram utilizados o reagente TaqMan® (Invitrogen-Life Technologies) e o aparelho CFX96 (Bio-Rad, Philadelphia, PA, EUA). As reações foram realizadas em triplicata com volume final de 13 µl por reação e quantidade de DNAC correspondente à 12,5 ng do RNA inicial. A reação de amplificação foi composta por 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (desnaturação e extensão). Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atingiu 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 dos genes avaliados. Todas as amostras foram submetidas a reações para a detecção de RNAm para β-Actina, utilizado como gene constitutivo da reação de amplificação. Além disso, os níveis de expressão de β-Actina foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo. Uma amostra negativa foi submetida à reação com cada par das sequências dos primers utilizados. As expressões relativas foram calculadas pelo método comparativo de 2^{-ddCt} (Livak e Schmittgen, 2001).

3.7 Análise da expressão em larga escala de microRNAs (miRs)

Para a realização da análise da expressão de miRs, foi utilizado o RNA total extraído para o ensaio de PCR em tempo real conforme descrito no item 3.6. As amostras foram submetidas ao sequenciamento de miRs, realizado na plataforma Illumina HiSeq (Illumina, San Diego, CA, EUA), com as versões mais recentes dos reagentes de sequenciamento e superfícies de clonagem, fornecendo até 300 GB em informações de sequenciamento por superfície de clonagem. A qualidade do RNA total foi avaliada utilizando o Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent, Lexington, MA, EUA), seguida pela conversão do RNA em fitas de DNAC. Para a geração das bibliotecas, foram utilizados kits TruSeq (Illumina) seguindo as instruções do fabricante. A

construção da biblioteca consiste na fragmentação aleatória dos miRs, seguida pela produção de DNAC com primers aleatórios. As extremidades do DNAC foram reparadas e foram adicionados a cauda poli A e os adaptadores para indexação (até 12 diferentes códigos de barras diferentes por faixa) durante os ciclos de sequenciamento. Previamente à geração dos clusters, os DNAC foram quantificados por meio de PCR em tempo real, realizada em termociclador Roche LightCycler 480 (Roche Applied Science, Penzberg, Bavaria, Alemanha), utilizando o kit Kapa Biosystems (Kapa Biosystems, Cambridge, MA, EUA). Os clusters foram gerados para render aproximadamente 725K-825K clusters/mm². Sua densidade e qualidade foram determinadas durante a corrida, após a avaliação dos parâmetros de adição da primeira base. Foram realizadas corridas de sequenciamento de emparelhamento final 2X50 bp para alinhar as sequências de DNAC para o genoma de referência. Previamente ao alinhamento, os dados foram convertidos para o formato FASTQ Sanger pelo programa FASTQ Groomer. O programa TopHat foi utilizado para alinhar leituras RNA-Seq com o genoma de referência, utilizando o programa Bowtie para alinhamento de sequências curtas, e para analisar os resultados do mapeamento, pela identificação de junções de splicing entre os exons. As leituras alinhadas pelo TopSeq foram utilizadas pelo Cufflinks para a montagem de transcritos, estimativa de abundância e testes de expressão e regulação diferenciais. A ferramenta Cuffcompare, que é parte de Cufflinks, comparou os transcritos montados com a anotação de referência e rastreou transcrições Cufflinks ao longo de vários experimentos. Por fim, o Cuffdiff indicou alterações significantes na expressão de transcritos de miRs. O arquivo BAM gerado pelo TopHat foi filtrado e a leitura foi pareada e mapeada. Foi criado um acúmulo desse arquivo filtrado de acordo com o modelo MAQ. Esse acúmulo foi filtrado para relatar variantes e para converter as coordenadas em intervalos, cobertos por um número determinado de leituras, com bases acima de um limiar de qualidade estabelecido.

3.8. Validação do sequenciamento de miRs por PCR em tempo real

Para confirmar os resultados da análise de sequenciamento de miRs, foram selecionados seis miRs (Tabela 3) para validação por PCR em tempo real, usando o kit QuantimiR-RT (Systems Biosciences-SBI, Mountain View, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As expressões relativas foram calculadas como citada no item 3.6 e normalizadas pela expressão de U6.

Tabela 3. Sequência de primers para as reações de PCR em tempo real

miRs	Sequência sense Sequência anti-sense
miR-146a - 5p	TGAGAACTGAATTCCATGGGTT GACGAGGACTCGAGCTCAAGCT
miR-146b - 5p	TGAGAACTGAATTCCATAGGCTGT GACGAGGACTCGAGCTCAAGCT3
miR-133a - 3p	TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTG GACGAGGACTCGAGCTCAAGCT3
miR-133b - 5p	GCTGGTCAAACGGAACCAAGT GACGAGGACTCGAGCTCAAGCT3
miR-29b - 3p	TAGCACCATTGAAATCAGTGTT GACGAGGACTCGAGCTCAAGCT3
miR-34a - 5p	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT GACGAGGACTCGAGCTCAAGCT3
miR-10a - 5p	TACCCTGTAGATCCGAATTTGTG GACGAGGACTCGAGCTCAAGCT3
U6	CGCTTCGGCAGCACATATAC CAGGGGCCATGCTAATCTT

3.9 Análise estatística

Os resultados das análises morfométricas e da expressão gênica foram submetidos ao teste de Kruskal–Wallis, seguido pelo teste de Fischer quando apropriado, para comparar a membrana de P(VDF-TrFE)/BT à de PTFE nos diferentes períodos. Para a análise da expressão de miRs, por PCR em tempo real, foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparar a membrana de P(VDF-TrFE)/BT à de PTFE. Para todas as comparações o nível de significância adotado foi de 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 *Análise morfométrica por micro-CT*

As imagens tridimensionais, obtidas por reconstrução da micro-CT, evidenciaram a formação óssea insignificante nos defeitos que não receberam membranas em 4 e 8 semanas (Figura 1A, D, G, J) e formação de tecido ósseo nas membranas de PTFE (Figura 1B, E, H, K) e de P(VDF-TrFE)/BT (Figura 1C, F, I, L) em 4 e 8 semanas. O volume ósseo não foi afetado pelas membranas ($p>0,05$), mas foi afetado pelo tempo ($p=0,05$ para ambas as membranas), sendo maior em 8 semanas comparado à 4 semanas (Figura 2A). A superfície óssea foi maior na membrana de P(VDF-TrFE)/BT comparada à de PTFE em 4 semanas ($p=0,01$) e 8 semanas ($p=0,001$), mas não foi afetada pelo tempo ($p>0,05$ para ambas as membranas) (Figura 2B). A superfície óssea específica não foi afetada pelas membranas ($p>0,05$), mas foi afetada pelo tempo ($p=0,01$ para ambas as membranas), reduzindo de 4 para 8 semanas (Figura 2C). O número de trabéculas não foi afetado tanto pelas membranas ($p>0,05$) quanto pelo tempo ($p>0,05$) (Figura 2D). A espessura das trabéculas não foi afetada pelas membranas ($p>0,05$), mas afetada foi pelo tempo ($p=0,01$ para ambas as membranas), sendo maior em 8 semanas comparada à 4 semanas (Figura 2E). A separação trabecular foi maior na membrana de PTFE comparada à de P(VDF-TrFE)/BT em 4 semanas ($p=0,05$) e em 8 semanas ($p=0,001$), mas não foi afetada pelo tempo ($p>0,05$) (Figura 2F).

Figura 1. Imagens tridimensionais dos defeitos criados nas calvárias de ratos que não receberam membrana (controle - A, D, G, J) e que foram implantados com membrana de PTFE (B, E, H, K) ou de P(VDFTrFE)/BT (C, F, I, L) em 4 (A-F) e 8 semanas (G-L). Foi observada uma formação óssea insignificante nos defeitos que não receberam membranas em 4 e 8 semanas (A, D, G, J) e tecido ósseo formado em ambas as membranas em 4 semanas (B, C, E, F) e 8 semanas (H, I, K, L). Barra de escala: 2 mm.

Figura 2. Parâmetros morfométricos, volume ósseo (A), superfície óssea (B), superfície óssea específica (C), número de trabéculas (D), espessura trabecular (E) e separação trabecular (F) do tecido ósseo formado nos defeitos criados nas calvárias de ratos e implantados com membrana de PTFE ou de P(VDFTrFE)/BT em 4 e 8 semanas, avaliados por micro-CT. * Indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

4.2 Análise histológica por microscopia de luz

A análise histológica confirmou os resultados obtidos por micro-CT e evidenciou uma formação insignificante de tecido ósseo e o defeito preenchido por tecido conjuntivo nos animais que não receberam membranas em 4 e 8 semanas (Figura 3A, D, G, J). Foi observada a formação de tecido ósseo nas membranas de PTFE (Figura 3B, E, H, K) e P(VDF-TrFE)/BT (Figura 3C, F, I, L) em ambos os lados das membranas sem sinais de processo inflamatório em 4 e 8 semanas. A membrana de PTFE apresentou íntimo contato com o tecido ósseo neoformado (Figura 3K) enquanto uma camada de tecido conjuntivo estava presente entre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT e o tecido ósseo (Figura 3L).

Figura 3. Microscopia de luz dos defeitos criados nas calvárias de ratos que não receberam membrana (controle - A, D, G, J) e que foram implantados com membrana de PTFE (B, E, H, K) ou de P(VDF-TrFE)/BT (C, F, I, L) em 4 (A-F) e 8 semanas (G-L). Foi observada a formação de tecido conjuntivo nos defeitos sem membrana em 4 e 8 semanas (A, D, G, J). A cabeça de seta indica a interface entre o tecido ósseo e o tecido conjuntivo (J). O tecido ósseo mineralizado recém-formado foi observado em ambos os lados das membranas em 4 (B, C) e 8 semanas (H, I). As setas indicam o íntimo contato entre o tecido ósseo e a membrana de PTFE (K) e uma camada de tecido conjuntivo entre o tecido ósseo e membrana de P(VDF-TrFE)/BT (L). Coloração: vermelho de Alizarina e azul de Stevenel. Barra de escala: A-C e G-I = 2 mm; D-F e J-L = 200 μ m.

4.3 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

A expressão gênica de RUNX2 não foi afetada pelas membranas em 4 semanas ($p>0,05$) e foi maior na membrana de P(VDF-TrFE)/BT comparada à de PTFE em 8 semanas ($p=0,001$) (Figura 4A). A expressão gênica de RUNX2 diminuiu na membrana de PTFE e aumentou na de P(VDF-TrFE)/BT de 4 para 8 semanas ($p=0,01$ e $p=0,001$, respectivamente) (Figura 4A). A expressão gênica da ALP não foi afetada pelas membranas em 4 semanas ($p>0,05$) e foi maior na membrana de PTFE comparada à de P(VDF-TrFE)/BT em 8 semanas ($p=0,05$) (Figura 4B). A expressão gênica de ALP diminuiu em ambas as membranas de 4 para 8 semanas ($p=0,01$ e $p=0,001$, respectivamente) (Figura 4B). A expressão gênica de BSP foi maior na

membrana de P(VDF-TrFE)/BT comparada à de PTFE em 4 semanas ($p=0,01$) e não foi afetada pelas membranas em 8 semanas ($p>0,05$) (Figura 4C). A expressão gênica de BSP diminuiu na membrana de P(VDF-TrFE)/BT de 4 para 8 semanas ($p=0,01$) e não foi afetada pelo tempo na de PTFE (Figura 4C). A expressão gênica do OC foi maior na membrana de P(VDF-TrFE)/BT comparada à de PTFE em 4 e 8 semanas ($p=0,001$ e $p=0,05$, respectivamente) (Figura 4D). A expressão gênica de OC aumentou na membrana de PTFE e diminuiu na P(VDF-TrFE)/BT de 4 para 8 semanas ($p=0,01$ para ambas as membranas) (Figura 4D). A expressão gênica de RANKL foi maior na membrana de PTFE comparada à de P(VDF-TrFE)/BT em 4 e 8 semanas ($p=0,001$ para os dois tempos experimentais) (Figura 4E). A expressão gênica de RANKL diminuiu nas membranas de PTFE e de P(VDF-TrFE)/BT de 4 para 8 semanas ($p=0,01$ para ambas as membranas) (Figura 4E). A expressão gênica de OPG foi maior na membrana de P(VDF-TrFE)/BT comparada à de PTFE em 4 semanas ($p=0,001$) e menor em 8 semanas ($p=0,001$) (Figura 4F). A expressão gênica de OPG diminuiu nas membranas de PTFE e de P(VDF-TrFE)/BT de 4 para 8 semanas ($p=0,01$ para ambas as membranas) (Figura 4F).

Figura 4. Expressão gênica de Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) (A), fosfatase alcalina (ALP) (B), sialoproteína óssea (BSP) (C), osteocalcina (OC) (D), receptor ativador of nuclear fator-kappa B ligand (RANKL) (E) e osteoprotegerina (OPG) (F) em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados nas calvárias de ratos e implantados com membrana de PTFE ou de P(VDF-TrFE)/BT em 4 e 8 semanas. A expressão gênica foi normalizada por β -actina e em relação à membrana de PTFE. * Indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

4.4 Análise da expressão em larga escala de miRs

O sequenciamento gerou um conjunto de 257 miRs para as amostras de 4 semanas e 276 miRs para as de 8 semanas com os respectivos valores de FPKM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped) para a membrana de P(VDF-TrFE)/BT e de PTFE. A razão entre os valores de FPKM para a membrana de P(VDF-TrFE)/BT e de PTFE em cada tempo experimental resultou no número de vezes que a expressão de um determinado miR foi maior ou menor nas células do tecido ósseo formado em contato com a membrana de P(VDF-TrFE)/BT em relação à de PTFE. A partir desses valores, selecionamos os miRs que foram regulados positivamente (>2 vezes – Tabela 4) ou negativamente (>2 vezes – Tabela 5).

Tabela 4. Expressão de miRs regulados positivamente (>2 vezes) pela membrana de P(VDF-TrFE)/BT comparada à de PTFE em 4 e 8 semanas

4 Semanas		8 Semanas	
miR	Aumento	miR	Aumento
miR-34a-5p	4,50	miR-34a-5p	3,00
miR-434-5p	4,00	miR-190a-5p	3,00
miR-137-3p	4,00	miR-28-3p	2,30
miR-30d-5p	2,07	miR-345-3p	3,00
miR-133b-3p	4,00	miR-133b-3p	2,33
miR-206-3p	9,00	miR-423-5p	3,33
miR-146a-5p	2,41	miR-10a-5p	3,47
miR-434-3p	2,40	miR-1-3p	2,17
miR-28-5p	2,66	miR-29b-3p	2,50
miR-139-5p	3,00	miR-144-3p	6,00
miR-322-3p	3,00	miR-214-3p	3,80
miR-152-5p	3,00	miR-99a-5p	2,24
miR-341	5,00	miR-30c-2-3p	3,00
miR-10a-5p	2,55		
miR-221-5p	2,66		
miR-450a-5p	2,13		
miR-17-5p	2,33		
miR-134-5p	3,00		
miR-130a-3p	6,50		
miR-145-5p	2,50		
miR-874-3p	3,00		
miR-378a-3p	2,55		
miR-221-3p	3,00		
miR-374-5p	2,50		
miR-19a-3p	3,00		
miR-1-3p	3,98		
miR-3473	2,17		
miR-181c-5p	3,50		
miR-652-3p	2,33		
miR-384-3p	4,00		
miR-129-5p	3,00		
miR-210-3p	3,66		
miR-127-3p	2,30		
miR-193-3p	3,00		
miR-24-2-5p	3,00		
miR-322-5p	3,16		
miR-541-5p	3,00		
miR-351-5p	2,60		
miR-133a-5p	3,00		
miR-409a-5p	6,00		
miR-125b-5p	2,18		
miR-146b-5p	2,80		
miR-133a-3p	73,33		
miR-511-3p	3,00		
miR-125a-5p	2,24		

Os miRs selecionados para a validação estão em negrito.

Tabela 5. Expressão de miRs regulados negativamente (>2 vezes) pela membrana de P(VDF-TrFE)/BT comparada à de PTFE em 4 e 8 semanas

4 Semanas		8 Semanas	
miR	Redução	miR	Redução
miR-31a-5p	2,00	miR-187-3p	2,00
miR-181d-5p	3,00	miR-34b-5p	4,00
miR-1298	2,00	miR-9a-5p	3,00
miR-708-3p	2,00	miR-181d-5p	2,00
miR-425-5p	2,00	miR-92b-3p	2,40
miR-410-3p	2,00	miR-34b-3p	4,00
miR-504	2,00	miR-497-5p	2,00
miR-338-3p	7,00	miR-335	3,00
miR-182	2,50	miR-223-3p	8,50
miR-144-5p	2,50	miR-1298	21,60
miR-99a-3p	2,00	miR-139-5p	4,00
		miR-142-3p	3,00
		miR-301a-3p	5,00
		miR-98-5p	2,00
		miR-20b-5p	3,00
		miR-132-3p	3,50
		miR-219a-5p	3,00
		miR-17-5p	11,00
		miR-128-3p	3,50
		miR-125b-1-3p	2,00
		miR-30e-3p	5,33
		miR-872-5p	2,00
		miR-18a-5p	2,00
		miR-9a-3p	3,50
		miR-182	9,67
		miR-92a-3p	2,52
		miR-598-3p	4,00
		miR-221-3p	2,50
		miR-106b-3p	2,00
		miR-361-5p	2,00
		miR-204-5p	7,09
		miR-144-5p	2,00
		miR-652-3p	4,50
		miR-93-5p	12,00
		miR-34c-5p	5,50
		miR-15b-5p	2,32
		miR-409a-5p	2,00
		miR-129-2-3p	5,00
		miR-183-5p	2,50

4.5 Validação do sequenciamento de miRs por PCR em tempo real

Para validar os resultados do sequenciamento dos miRs, avaliamos as expressões de miR-146a-5p, -146b-5p e -133a-3p em 4 semanas e de miR-29b-3p, -34a-5p e -10a-5p em 8 semanas. Todos os miRs avaliados apresentaram expressão aumentada ($p=0,01$) na membrana de P(VDF-TrFE)/BT em relação à de PTFE (Figura 5).

Figura 5: Expressão de miR-146a-5p (A), -146b-5p (C) e -133a-3p (E) em 4 semanas e de miR-29b-3p (B), -34a-5p (D) e -10a-5p (F) em 8 semanas, em células do tecido ósseo formado nos defeitos criados nas calvárias de ratos e implantados com membrana de PTFE ou de P(VDFTrFE)/BT. A expressão dos miRs foi normalizada por U6 e em relação à membrana de PTFE. * Indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que tanto a membrana de P(VDF-TrFE)/BT quanto a de PTFE permitem a formação de tecido ósseo quando implantadas em defeitos criados em calvárias de ratos. A resposta óssea foi significativamente maior na membrana de P(VDF-TrFE)/BT quando comparada à de PTFE, em termos de parâmetros morfométricos e de expressão de genes marcadores do fenótipo osteoblástico. Além disso, as diferenças observadas na expressão de miRs podem estar relacionadas ao maior potencial osteogênico da membrana de P(VDF-TrFE)/BT.

Estudos prévios mostraram que a interface entre a membrana de PTFE e o tecido ósseo pode ser caracterizada por um íntimo contato ou pela presença de um tecido conjuntivo entre a membrana e o osso neoformado (Crump *et al.*, 1996; Salata *et al.*, 2001). Nesse estudo, foi observado que tanto a membrana de P(VDF-TrFE)/BT quanto a de PTFE, cumpriram a função de permitir a formação de um novo tecido ósseo; no entanto, a membrana de PTFE apresentou um contato direto com o tecido ósseo, enquanto uma delgada camada de tecido conjuntivo ocupava o espaço entre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT e o tecido ósseo. Essa característica encontrada na membrana de P(VDF-TrFE)/BT pode favorecer o seu uso clínico, uma vez que se trata de um material não absorvível e que deverá ser removido após a ROG. Além disso, notamos nas imagens histológicas e de micro-CT a atividade osteogênica em ambos os lados, superior e inferior, das membranas, em contraste com outro estudo que mostrou osteogênese apenas no lado superior da membrana de PTFE (Crump *et al.*, 1996). A preservação do periósteo e da dura-máter durante os procedimentos cirúrgicos poderia explicar tal diferença entre os resultados, uma vez que essas estruturas desempenham papéis importantes na regeneração óssea (Takagi e Urist, 1982; Crump *et al.*, 1996).

A análise histológica do tecido ósseo representa uma ferramenta valiosa para observar e descrever características morfológicas desse tecido; no entanto, ela não permite a reconstrução tridimensional a partir de cortes em série, uma vez que cerca de 50 µm de espessura é perdida durante o processo de confecção da lâmina (Stiller *et al.*, 2009). Assim, no presente estudo, a análise morfométrica foi realizada utilizando

imagens tridimensionais obtidas a partir de micro-CT, seguindo parâmetros previamente estabelecidos (Bouxsein *et al.*, 2010). A comparação entre PTFE expandido com poli(carbonato de trimetileno) e a membrana de colágeno poroso não revelou diferenças em termos de formação óssea (percentual de fechamento do defeito) em defeitos mandibulares de ratos avaliada por micro-CT (Van Leeuwen *et al.*, 2012). Nesse estudo, entre os seis parâmetros morfométricos avaliados, quatro deles foram semelhantes entre as duas membranas. Já a superfície óssea foi maior e a separação trabecular foi menor na membrana de P(VDF-TrFE)/BT em comparação à de PTFE em 4 e 8 semanas. Tais resultados corroboram os nossos resultados *in vitro*, que mostraram que esse compósito favorece a diferenciação osteoblástica de células derivadas de osso alveolar humano (Beloti *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2011).

A qualidade da interação tecido/membrana tem sido determinada por respostas das células aos biomateriais e alguns estudos *in vivo* têm investigado aspectos celulares e moleculares da ROG, além das análises histológicas e morfométricas (Tanaka *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2008; Miron *et al.*, 2013). Nesse contexto, nós avaliamos a expressão gênica de importantes marcadores osteoblásticos e de miRs no tecido ósseo neoformado em contato com as membranas de P(VDF-TrFE)/BT e de PTFE. A expressão gênica de RUNX2, um regulador importante da osteogênese, e OC e BSP, as duas mais abundantes proteínas da matriz não colágena envolvidas na modulação do processo de mineralização, foi maior no tecido ósseo formado em contato com a membrana de P(VDF-TrFE)/BT em pelo menos um dos dois períodos experimentais avaliados, 4 e 8 semanas (Owen *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1991; Komori *et al.*, 1997; Teixeira *et al.*, 2011). A expressão gênica de RANKL, um potente indutor da osteoclastogênese, foi menor no tecido ósseo formado em contato com a membrana de P(VDF-TrFE)/BT em 4 e 8 semanas, enquanto a expressão gênica de OPG, um receptor que atua como inibidor competitivo da ação do RANKL, foi maior em 4 semanas e menor em 8 semanas na membrana de P(VDF-TrFE)/BT, respectivamente (Simonet *et al.*, 1997; Fuller *et al.*, 1998). Esses resultados indicam que, além de favorecer a formação óssea, a membrana de P(VDF-TrFE)/BT previne a reabsorção óssea por uma menor ativação dos osteoclastos. Vale ressaltar que a diminuição da expressão gênica de RANKL e

de OPG de 4 para 8 semanas, sugere uma redução no processo de remodelação óssea exibida pelas duas membranas após 8 semanas de implantação.

As características dos biomateriais podem contribuir para explicar as diferenças observadas em termos de formação de tecido ósseo e respostas celulares entre as membranas de P(VDF-TrFE)/BT e de PTFE. Embora a topografia e a rugosidade de superfície sejam semelhantes para ambas as membranas, variando entre 0,15 μm ou e 0,20 μm , a membrana de P(VDF-TrFE)/BT apresenta uma superfície com mais molhabilidade que a de PTFE, como indicado pela medição do ângulo de contato, que foi de aproximadamente 70° e 110°, respectivamente (Teixeira *et al.*, 2011). Molhabilidade tem sido considerada uma característica essencial dos biomateriais, devido à regulação da adsorção de proteínas e, conseqüentemente, da interação célula/substrato (Anselme, 2000; Wei *et al.*, 2009). Além disso, tem sido mostrado que as propriedades piezoelétricas do titanato de bário também modulam a adsorção proteica sobre a superfície do material e podem afetar o processo de osteogênese (Park *et al.*, 1981; Baxter *et al.*, 2010). Portanto, a maior formação óssea observada em contato com a membrana de P(VDF-TrFE)/BT pode ser, pelo menos em parte, devido à molhabilidade e à piezoelectricidade e à conseqüente maior capacidade de ligação a proteínas em comparação à membrana de PTFE.

Considerando que os mecanismos envolvidos no potencial osteogênico da membrana de P(VDF-TrFE)/BT não são completamente entendidos e que miRs regulam a diferenciação osteoblástica e a formação óssea, nesse estudo avaliamos a expressão de miRs no tecido ósseo formado em contato com as membranas de P(VDF-TrFE)/BT e de PTFE. As diferenças numéricas observadas entre os dados obtidos pelo sequenciamento e por PCR em tempo real estão relacionadas ao fato de que o sequenciamento quantifica miRs primários, pré-miRs e miRs maduros, enquanto o PCR em tempo real quantifica apenas miRs maduros. Entre os miRs regulados positivamente pela membrana de P(VDF-TrFE)/BT, alguns deles podem estar relacionados com o seu potencial osteogênico, como o miR-29b que promove a osteogênese por uma regulação negativa de inibidores da diferenciação osteoblástica (Li *et al.*, 2009). O miR-146a e o -146b também são relevantes, uma vez que regulam negativamente a SMAD7 (banco de dados GeneCards e TargetScan - <http://www.genecards.org> / <http://www.targetscan.org>). Quanto aos miRs regulados

negativamente pela membrana de P(VDF-TrFE)/BT, o miR-31 é considerado um inibidor da osteogênese (Deng *et al.*, 2014) e possui um papel importante na osteoclastogênese e no controle da reabsorção óssea (Baglio *et al.*, 2013). Os resultados iniciais são promissores e novos experimentos são necessários para a avaliação funcional de miRs que possam estar envolvidos com o potencial osteogênico da membrana de P(VDF-TrFE)/BT.

6. CONCLUSÕES

A membrana de P(VDF-TrFE)/BT promoveu uma maior formação óssea comparada à membrana de PTFE em termos de parâmetros morfométricos e de expressão de genes marcadores do fenótipo osteoblástico. Além disso, a membrana de P(VDF-TrFE)/BT modulou a expressão de miRs importantes na no processo de osteogênese. Dessa forma, esse compósito representa uma alternativa promissora para ser utilizado em procedimentos de ROG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, v. 21, n. 7, p. 667-81, Apr 2000. ISSN 0142-9612 (Print)

BAGLIO, S. R. et al. MicroRNA expression profiling of human bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation reveals Osterix regulation by miR-31. *Gene*, v. 527, n. 1, p. 321-31, Sep 15 2013. ISSN 1879-0038 (Electronic)

BARTEE, B. K.; CARR, J. A. Evaluation of a high-density polytetrafluoroethylene (n-PTFE) membrane as a barrier material to facilitate guided bone regeneration in the rat mandible. *J Oral Implantol*, v. 21, n. 2, p. 88-95, 1995. ISSN 0160-6972 (Print)

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, v. 116, n. 2, p. 281-97, Jan 23 2004. ISSN 0092-8674 (Print)

BAXTER, F. R. et al. Electrically active bioceramics: a review of interfacial responses. *Ann Biomed Eng*, v. 38, n. 6, p. 2079-92, Jun 2010. ISSN 1573-9686 (Electronic)

BELOTI, M. M. et al. In vitro biocompatibility of a novel membrane of the composite poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate. *J Biomed Mater Res A*, v. 79, n. 2, p. 282-8, Nov 2006. ISSN 1549-3296 (Print)

BLUMENTHAL, N. M. A clinical comparison of collagen membranes with e-PTFE membranes in the treatment of human mandibular buccal class II furcation defects. *J Periodontol*, v. 64, n. 10, p. 925-33, Oct 1993. ISSN 0022-3492 (Print)

BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, v. 25, n. 7, p. 1468-86, Jul 2010. ISSN 1523-4681 (Electronic)

CAFFESSE, R. G. et al. Class II furcations treated by guided tissue regeneration in humans: case reports. *J Periodontol*, v. 61, n. 8, p. 510-4, Aug 1990. ISSN 0022-3492 (Print)

CATON, J.; GREENSTEIN, G.; ZAPPA, U. Synthetic bioabsorbable barrier for regeneration in human periodontal defects. *J Periodontol*, v. 65, n. 11, p. 1037-45, Nov 1994. ISSN 0022-3492 (Print)

CHEN, J. et al. Immunohistochemical localization of bone sialoprotein in foetal porcine bone tissues: comparisons with secreted phosphoprotein 1 (SPP-1, osteopontin) and SPARC (osteonectin). *Histochem J*, v. 23, n. 6, p. 281-9, Jun 1991. ISSN 0018-2214 (Print)

CRUMP, T. B. et al. Influence of three membrane types on healing of bone defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 82, n. 4, p. 365-74, Oct 1996. ISSN 1079-2104 (Print)

DAHLIN, C. et al. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg*, v. 81, n. 5, p. 672-6, May 1988. ISSN 0032-1052 (Print).

DENG, Y. et al. Repair of critical-sized bone defects with anti-miR-31-expressing bone marrow stromal stem cells and poly(glycerol sebacate) scaffolds. *European cells & materials*, v. 27, p. 13-24; discussion 24-5, 2014. ISSN 1473-2262 (Electronic)

DIAS, C. J.; DAS-GUPTA, D. K. Poling behaviour of ceramic/polymer ferroelectric composites. *Ferroelectrics*, v. 157, n. 1, p. 405-410, 1994/07/01 1994. ISSN 0015-0193.

DOS ANJOS, B. et al. Clinical comparison of cellulose and expanded polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of class II furcations in mandibular molars with 6-month re-entry. *J Periodontol*, v. 69, n. 4, p. 454-9, Apr 1998. ISSN 0022-3492 (Print)

EGUCHI, T. et al. OsteoMiR: a novel panel of microRNA biomarkers in osteoblastic and osteocytic differentiation from mesenchymal stem cells. *PloS one*, v. 8, n. 3, p. e58796, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

FULLER, K. et al. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med*, v. 188, n. 5, p. 997-1001, Sep 7 1998. ISSN 0022-1007 (Print)

GAMEZ, B.; RODRIGUEZ-CARBALLO, E.; VENTURA, F. MicroRNAs and post-transcriptional regulation of skeletal development. *Journal of molecular endocrinology*, v. 52, n. 3, p. R179-97, 2014. ISSN 1479-6813 (Electronic)

GENTILE, P. et al. Polymeric membranes for guided bone regeneration. *Biotechnol J*, v. 6, n. 10, p. 1187-97, Oct 2011. ISSN 1860-7314 (Electronic)

GIMENES, R. et al. Composites PVDF-TrFE/BT used as bioactive membranes for enhancing bone regeneration. 2004. p.539-547.

GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim*, v. 45, n. 1, p. 14-24, Jan 2011. ISSN 1758-1117 (Electronic)

GRIFFITHS-JONES, S. et al. MicroRNA evolution by arm switching. *EMBO reports*, v. 12, n. 2, p. 172-7, Feb 2011. ISSN 1469-3178 (Electronic)

HAMMERLE, C. H.; JUNG, R. E. Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontology 2000*, v. 33, p. 36-53, 2003. ISSN 0906-6713 (Print)

HASSAN, M. Q. et al. A network connecting Runx2, SATB2, and the miR-23a~27a~24-2 cluster regulates the osteoblast differentiation program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 46, p. 19879-84, Nov 16 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic)

HASSAN, M. Q. et al. miR-218 directs a Wnt signaling circuit to promote differentiation of osteoblasts and osteomimicry of metastatic cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, v. 287, n. 50, p. 42084-92, Dec 7 2012. ISSN 1083-351X (Electronic)

JUNG, R. E. et al. Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12-14 years. *Clin Oral Implants Res*, v. 24, n. 10, p. 1065-73, Oct 2013. ISSN 1600-0501 (Electronic)

KARRING, T. et al. Development of the biological concept of guided tissue regeneration--animal and human studies. *Periodontol 2000*, v. 1, p. 26-35, Feb 1993. ISSN 0906-6713 (Print)

KATO, R. B. et al. Nanotopography Directs Mesenchymal Stem Cells to Osteoblast Lineage Through Regulation of microRNA-SMAD-BMP-2 Circuit. *Journal of Cellular Physiology*, p. n/a-n/a, 2014. ISSN 1097-4652.

KOMORI, T. et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, v. 89, n. 5, p. 755-64, May 30 1997. ISSN 0092-8674 (Print)

LAURELL, L. et al. Clinical use of a bioresorbable matrix barrier in guided tissue regeneration therapy. Case series. *J Periodontol*, v. 65, n. 10, p. 967-75, Oct 1994. ISSN 0022-3492 (Print)

LAURELL, L.; GOTTLOW, J. Guided tissue regeneration update. *Int Dent J*, v. 48, n. 4, p. 386-98, Aug 1998. ISSN 0020-6539 (Print)

LI, X. et al. Increased RANK ligand in bone marrow of orchietomized rats and prevention of their bone loss by the RANK ligand inhibitor osteoprotegerin. *Bone*, v. 45, n. 4, p. 669-76, Oct 2009. ISSN 1873-2763 (Electronic)

LIAN, J. B. et al. MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nature reviews. Endocrinology*, v. 8, n. 4, p. 212-27, Apr 2012. ISSN 1759-5037 (Electronic)

LIMA, L. L. et al. Guided tissue regeneration may modulate gene expression in periodontal intrabony defects: a human study. *J Periodontal Res*, v. 43, n. 4, p. 459-64, Aug 2008. ISSN 1600-0765 (Electronic)

LINDE, A.; HEDNER, E. Recombinant bone morphogenetic protein-2 enhances bone healing, guided by osteopromotive e-PTFE membranes: an experimental study in rats. *Calcif Tissue Int*, v. 56, n. 6, p. 549-53, Jun 1995. ISSN 0171-967X (Print)

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, Dec 2001. ISSN 1046-2023 (Print)

MACEDO, N.; JARDINI, M.; OKAMOTO, T. Reação tecidual às membranas para regeneração tecidual dirigida: estudo com implante subcutâneo de dois tipos de membranas em ratos. *Rev Gaucha Odont* v. 43, p. 101-104, 1995.

MANIATOPOULOS, C. et al. An improved method for preparing histological sections of metallic implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 1, n. 1, p. 31-7, Summer 1986. ISSN 0882-2786 (Print)

MATSUMOTO, G. et al. Alveolar bone regeneration using poly-(lactic acid-co-glycolic acid-co-epsilon-caprolactone) porous membrane with collagen sponge containing basic fibroblast growth factor: an experimental study in the dog. *J Biomater Appl*, v. 27, n. 4, p. 485-93, Nov 2012. ISSN 1530-8022 (Electronic)

MATTSON, J. S.; GALLAGHER, S. J.; JABRO, M. H. The use of 2 bioabsorbable barrier membranes in the treatment of interproximal intrabony periodontal defects. *J Periodontol*, v. 70, n. 5, p. 510-7, May 1999. ISSN 0022-3492 (Print)

MIRON, R. J. et al. Osteoblast proliferation and differentiation on a barrier membrane in combination with BMP2 and TGFbeta1. *Clin Oral Investig*, v. 17, n. 3, p. 981-8, Apr 2013. ISSN 1436-3771 (Electronic)

NART, J. et al. Use of guided tissue regeneration in the treatment of a lateral periodontal cyst with a 7-month reentry. *J Periodontol*, v. 78, n. 7, p. 1360-4, Jul 2007. ISSN 0022-3492 (Print)

NOVAES, A. B., JR. et al. Bacterial colonization of the external and internal sulci and of cellulose membranes at time of retrieval. *J Periodontol*, v. 66, n. 10, p. 864-9, Oct 1995. ISSN 0022-3492 (Print)

OH, T. J. et al. Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects. *Clin Oral Implants Res*, v. 14, n. 1, p. 80-90, Feb 2003. ISSN 0905-7161 (Print)

OWEN, T. A. et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*, v. 143, n. 3, p. 420-30, Jun 1990. ISSN 0021-9541 (Print)

PARK, J. B. et al. Piezoelectric ceramic implants: in vivo results. *J Biomed Mater Res*, v. 15, n. 1, p. 103-10, Jan 1981. ISSN 0021-9304 (Print)

PAWLICKI, J. M.; STEITZ, J. A. Nuclear networking fashions pre-messenger RNA and primary microRNA transcripts for function. Trends in cell biology, v. 20, n. 1, p. 52-61, Jan 2010. ISSN 1879-3088 (Electronic)

POLSON, A. M. et al. Guided tissue regeneration in human furcation defects after using a biodegradable barrier: a multi-center feasibility study. J Periodontol, v. 66, n. 5, p. 377-85, May 1995. ISSN 0022-3492 (Print)

PONTORIERO, R. et al. Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in man. J Clin Periodontol, v. 14, n. 10, p. 618-20, Nov 1987. ISSN 0303-6979 (Print)

RONDA, M. et al. Expanded vs. dense polytetrafluoroethylene membranes in vertical ridge augmentation around dental implants: a prospective randomized controlled clinical trial. Clin Oral Implants Res, Apr 8 2013a. ISSN 1600-0501 (Electronic)

_____. Expanded vs. dense polytetrafluoroethylene membranes in vertical ridge augmentation around dental implants: a prospective randomized controlled clinical trial. Clinical oral implants research, Apr 8 2013b. ISSN 1600-0501 (Electronic)

SALATA, L. A. et al. In vitro and in vivo evaluation of e-PTFE and alkali-cellulose membranes for guided bone regeneration. Clin Oral Implants Res, v. 12, n. 1, p. 62-8, Feb 2001. ISSN 0905-7161 (Print)

SIMONET, W. S. et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell, v. 89, n. 2, p. 309-19, Apr 18 1997. ISSN 0092-8674 (Print)

STILLER, M. et al. Quantification of bone tissue regeneration employing beta-tricalcium phosphate by three-dimensional non-invasive synchrotron microtomography - a comparative examination with histomorphometry. Bone, v. 44, n. 4, p. 619-28, Apr 2009. ISSN 1873-2763 (Electronic)

TAKAGI, K.; URIST, M. R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. Ann Surg, v. 196, n. 1, p. 100-9, Jul 1982. ISSN 0003-4932 (Print)

TANAKA, S. et al. Characteristics of newly formed bone during guided bone regeneration: analysis of cbfa-1, osteocalcin, and VEGF expression. J Oral Implantol, v. 33, n. 6, p. 321-6, 2007. ISSN 0160-6972 (Print)

TEIXEIRA, L. N. et al. Response of human alveolar bone-derived cells to a novel poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene)/barium titanate membrane. J Mater Sci Mater Med, v. 22, n. 1, p. 151-8, Jan 2011. ISSN 1573-4838 (Electronic)

TEIXEIRA, L. N. et al. In vitro biocompatibility of poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene)/barium titanate composite using cultures of human periodontal ligament fibroblasts and keratinocytes. Acta Biomater, v. 6, n. 3, p. 979-89, Mar 2010. ISSN 1878-7568 (Electronic)

VAN LEEUWEN, A. C. et al. Guided bone regeneration in rat mandibular defects using resorbable poly(trimethylene carbonate) barrier membranes. Acta Biomater, v. 8, n. 4, p. 1422-9, Apr 2012. ISSN 1878-7568 (Electronic)

VIMALRAJ, S.; SELVAMURUGAN, N. MicroRNAs: Synthesis, Gene Regulation and Osteoblast Differentiation. Current issues in molecular biology, v. 15, n. 1, p. 7-18, May 11 2012. ISSN 1467-3045 (Electronic)

WEI, J. et al. Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. Biomed Mater, v. 4, n. 4, p. 045002, Aug 2009. ISSN 1748-605X (Electronic)

*De acordo com o estilo ABNT