

Plan Overview

A Data Management Plan created using DMPTool-Stage

Title: Efeitos do tratamento tópico da melatonina associada à membrana osteogênica e à proteína rhBMP-2 sobre o remodelamento ósseo

Creator: Bruno Pereira

Affiliation: Universidade Federal de São Paulo (unifesp.br)

Funder: São Paulo Research Foundation (fapesp.br)

Template: Digital Curation Centre

Project abstract:

Este estudo busca avaliar os efeitos sinérgicos do tratamento da melatonina associada a uma membrana osteogênica e à BMP-2 sobre a recuperação de uma lesão óssea. Este projeto é inovador, pois além de tratar a questão apresentada, da visão morfológica, evidenciando os reais efeitos de cada tipo de tratamento e sua possível eficácia; incluiremos uma nova visão do entendimento do tecido de forma geral com análises de biologia molecular, o que nos trará um maior esclarecimento de como cada tipo de tratamento estará apresentando os resultados morfológicos observados. Sendo assim serão avaliados os efeitos da administração da melatonina tópica em diferentes concentrações no reparo ósseo em defeitos ósseos cirúrgicos através da técnica, associada ou não à rhBMP-2 por meio das seguintes técnicas: a) Avaliação qualitativa por análise histopatológica por meio de microscópio de luz. b) Avaliação quantitativa por meio da técnica de estereologia. c) Avaliação de fatores angiogênicos, osteogênicos e osteoclastogênicos por meio da técnica de imunistoquímica. d) Avaliação da expressão gênica de citocinas (IL-1², IL-6, IL-10 e TNF- \pm), marcadores da osteoclastogênese (RANK, RANKL e OPG) e MMPs (MMP-1, MMP-8 e MMP-13).

Start date: 03-31-2020

End date: 03-30-2022

Last modified: 04-07-2021

Copyright information:

The above plan creator(s) have agreed that others may use as much of the text of this plan as they would like in their own plans, and customize it as necessary. You do not need to credit the creator(s) as the source of the language used, but using any of the plan's text does not imply that the creator(s) endorse, or have any relationship to, your project or proposal

Efeitos do tratamento tópico da melatonina associada à membrana osteogênica e à proteína rhBMP-2 sobre o remodelamento ósseo

Constituem os objetivos gerais do estudo, avaliar os efeitos da administração da melatonina tópica em diferentes concentrações no reparo ósseo em defeitos ósseos cirúrgicos através da técnica de ROG, associada ou não à rhBMP-2.

Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos da administração da melatonina tópica em diferentes concentrações no reparo ósseo em defeitos ósseos cirúrgicos através da técnica de ROG, associada ou não à rhBMP-2 por meio das seguintes técnicas:

- a) Avaliação qualitativa por análise histopatológica por meio de microscópio de luz.
- b) Avaliação quantitativa por meio da técnica de estereologia.
- c) Avaliação de fatores angiogênicos, osteogênicos e osteoclastogênicos por meio da técnica de imunoistoquímica.
- d) Avaliação da expressão gênica de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α), marcadores da osteoclastogênese (RANK, RANKL e OPG) e MMPs (MMP-1, MMP-8 e MMP-13).

Após a decapitação do animal com anestesia prévia, a calvária será removida, utilizando-se para isso tesouras e pinças adequadas estéreis. Os tecidos moles presentes serão cuidadosamente separados deste tecido ósseo do crânio, para a obtenção do fragmento ósseo contendo o defeito com margem de segurança. Esses fragmentos serão imersos na mesma solução fixadora por 24 horas. Em seguida, os espécimes serão descalcificados em EDTA a 0,5 M, trocando-se as soluções a cada 2 dias. Após o período de descalcificação, que variará de 15 a 30 dias, a ação do ácido será neutralizada por 24 horas em uma solução de sulfato de sódio a 5%. Em seguida, serão desidratados em série crescente de álcoois: 70 % (overnight), 80 %, 85 %, 90 %, 95 % e 100 % (2 horas em cada concentração). Feito isso, esses blocos ósseos serão colocados em partes iguais de álcool e xilol (overnight) e diafanizados em xilol, com trocas a cada 2 horas, sendo executadas 3 trocas; e inclusão em parafina. De cada amostra serão realizados cortes semi-seriados de 6 μ m de espessura. Esses cortes serão corados por tricrômio de masson para quantificação óssea e picro sírius red para quantificação do colágeno total, ambos observados em microscopia de luz.

Análise qualitativa ao microscópio de luz

A análise qualitativa das lâminas permitirá avaliar o osso neoformado na área de criação do defeito ósseo, bem como diferenciar o osso existente e o neoformado nos grupos experimentais. Será utilizado um microscópio de luz (AxioImager Z2, Carl Zeiss, Germany) acoplado a câmera digital adquirido com auxílio de outros 2 projetos FAPESP passados. As imagens digitais serão analisadas através de objetivas com 5X, 10X, 20X, 32X, 40X, 63X e 100X de aumento. Para avaliação das imagens será utilizado os softwares AxioVision da Zeiss com diferentes módulos instalados e o software Stereo Investigator da MBF Bioscience (USA).

Análise quantitativa

A quantificação do osso neoformado, em cada animal, será realizada por meio de princípios estereológicos, utilizando-se o software Stereo Investigator (MBF Bioscience, USA), buscando deste modo, fornecer precisão nos resultados obtidos, pois

será avaliado este tecido em recuperação em toda a extensão do defeito ósseo. Deste modo, com os recursos disponíveis no microscópio e deste software, será possível realizar uma análise não somente bidimensional, mas tridimensional do tecido em recuperação com o auxílio destas sondas estereológicas presentes no software.

3.9. Análise imunoistoquímica

Será realizada a imunomarcagem de fatores angiogênicos e osteogênicos, sendo eles: OPG (ab73400), sialoproteína (ab52128), CD31(ab18298), VEGFR2(ab2349), osteopontina (ab8448), RUNX2 (ab19225), Osteocalcina (ab13418); TRAP (ab19140). Além disso, será marcado fatores inflamatórios IL-1 β (ab19140), IL-6(ab9324), IL10(ab192271) e TNF- α (ab22021), fatores da osteoclastogênese RANK(ab13918), RANKL(ab23960) e OPG(ab73400) e metaloproteinases – MMPs, MMP-1(ab137332), MMP-8(ab53017) e MMP-13(ab219620). Posteriormente ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (10 volumes) das ligações inespecíficas com PBS/BSA 2 % por uma hora cada, os cortes serão mergulhados em solução de tampão citrato pH 6,0 em banho-maria para recuperação antigênica. Após o resfriamento e lavagem em PBS, as amostras serão incubadas com os anticorpos primários por dezoito horas a 4-8 °C. A seguir, os cortes serão lavados em PBS e incubados a 4-8 °C por 3 horas com o anticorpo secundário. A reação será revelada com solução de diaminobenzidina (0,5 mg/mL) e peróxido de hidrogênio líquido (0,005 mL/100 mL) em PBS por 10 minutos. Os cortes serão lavados em PBS, contraincolorados com hematoxilina de Mayer, desidratados, diafanizados e cobertos com lamínulas utilizando-se Entellan (Merck).

Análise de expressão gênica

As amostras ósseas serão submetidas ao isolamento do RNA e amplificação do cDNA por RT-PCR. A quantificação de citocinas [IL-1 β (ab19140), IL-6(ab9324), IL10(ab192271) e TNF- α (ab22021)], marcadores da osteoclastogênese [RANK(ab13918), RANKL(ab23960) e OPG(ab73400)] e MMPs [MMP-1(ab137332), MMP-8(ab53017) e MMP-13(ab219620)] serão avaliadas por meio de expressão gênica. As amostras serão mantidas em RNAlater (Life Technologies Corporation – Carlsbad, CA, EUA) e congeladas a -80°C até o dia do processamento, quando serão descongeladas, trituradas e homogeneizadas em homogeneizador de tecidos (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK, EUA).

A extração de RNA total será realizada utilizando o kit de extração Purelink mini kit (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Alíquotas de 1 μ L serão utilizadas para avaliar a pureza e estimar a concentração de RNA em ng/uL de cada amostra, utilizando o Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA).

Após a extração do RNA, o DNA complementar (cDNA) será sintetizado utilizando 1 μ g de RNA total e o kit High Capacity (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA).

A análise quantitativa da expressão de RNAm será realizada por meio do StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando o sistema de fluorescência TaqMan (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA) para a quantificação dos produtos de amplificação. As condições padrão de PCR consistirão de: 95°C (2 minutos), seguidas por 40 ciclos de 95°C (1 segundo) e 60°C (20 segundos). Para a análise do RNAm, o cálculo para determinação da expressão relativa do gene de interesse será realizado de acordo com as instruções do fabricante

(Applied Biosystems User's Bulletin - P/N 4303859), utilizando como referência a expressão de beta-actina (Actb) e de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh) na mesma amostra, utilizando-se do método do $\Delta\Delta Ct$. A média dos valores de Ct obtidas de duplicatas será utilizada para o cálculo da expressão gênica, a qual será comparada aos valores do gene alvo e gene de referência de uma amostra controle para o cálculo da expressão relativa, por meio da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Estas análises são de vital importância, devido ao seu refinado poder de resolução, nos permitindo saber de forma mais abrangente como o tecido ósseo reage as intervenções a serem realizadas nesse projeto; tendo em vista que a grande maioria dos trabalhos analisam estes fatores em seções teciduais, o que diminui a sensibilidade dos dados a serem obtidos. A implantação desta modalidade de análise em meu laboratório irá ampliar o arcabouço de variáveis que podemos buscar neste e em outros projetos, além de assim como descrito, trará uma maior precisão da reação do tecido como um todo as metodologias por nós aplicadas.

Os dados serão inseridos em planilhas do programa Excel, em abas específicas para cada análise realizada, para possibilitar posterior análise estatística em programa específico.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da instituição, assegurando o cumprimento de todos os critérios de bioética.

Os dados gerados são de propriedade da Universidade podendo, porém, ficar disponíveis em bancos públicos após a publicação dos artigos científicos em revistas especializadas. O acesso aos artigos científicos seguirá os critérios das normas de acesso do periódico.

Os dados serão armazenados no sistema de nuvem Google Drive nos computadores pessoais dos pesquisadores envolvidos, e cópias dos conteúdos serão armazenadas em um HD externo.

O acesso ao conteúdo será realizado pelos pesquisadores envolvidos no projeto, através de senha. Os dados poderão ser disponibilizados para todos que tiveram legítimo e comprovado interesse nos dados e solicite acesso a eles.

Todos os dados obtidos serão armazenados, por pelo menos 10 anos, após o final do estudo.

Todos os dados obtidos serão armazenados, por pelo menos 10 anos, após o final do estudo.

Os dados serão compartilhados por meio de apresentações em congressos, pela publicação de artigos científicos e pelo repositório institucional da Universidade

Os dados poderão ser compartilhados após a publicação dos trabalhos em revistas científicas. É possível que haja alguma restrição no compartilhamento de dados devido o interstício imposto pelo copyright das revistas científicas as quais os dados serão submetidos.

Os pesquisadores envolvidos no projeto, serão responsáveis pelos dados.

Os recursos necessários consistem em amplo acesso a plataformas online que permitam a coleta de documentos e a conexão com os interessados. Será necessário também o auxílio financeiro de uma agência de fomento para a

execução deste projeto.
