



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

Júlio César Silva de Oliveira

**AVALIAÇÃO DA MEMBRANA DE COLÁGENO DE PEIXE NA
REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA. ESTUDO HISTOLÓGICO,
HISTOMORFOMÉTRICO, IMUNOISTOQUÍMICO, MICRO
TOMOGRÁFICO EM CALOTAS DE RATOS**

**Araçatuba – SP
2022**

Júlio César Silva de Oliveira

**AVALIAÇÃO DA MEMBRANA DE COLÁGENO DE PEIXE NA
REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA. ESTUDO HISTOLÓGICO,
HISTOMORFOMÉTRICO, IMUNOISTOQUÍMICO, MICRO
TOMOGRÁFICO EM CALOTAS DE RATOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
do Campus de Araçatuba – Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
UNESP, para obtenção do Título de Doutor em
Odontologia (Área de concentração em
Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-
Facial).

Orientadora: Profa. Assoc. Ana Paula F Bassi
Coorientação: Profa. Assoc. Marisa Ap. C.
Gabrielli

**Araçatuba – SP
2022**

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

- O48a Oliveira, Júlio César Silva de.
Avaliação da membrana de colágeno de peixe na regeneração óssea guiada. estudo histológico, histomorfométrico, imunoistoquímico, micro tomográfico em calotas de ratos / Júlio César Silva de Oliveira. - Araçatuba, 2022
83 f. : il. ; graf.
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Profa. Ana Paula Farnezi Bassi
Coorientadora: Profa. Marisa Aparecida Cabrini Gabrielle
1. Membranas 2. Regeneração óssea 3. Implantes dentários
I. T.
- Black D7
CDD 617.64

A Deus,

Ao nosso Criador em primeiro lugar. Tudo o que somos, construímos, ou buscamos existe se não for a partir de suas Bênçãos e Graça. D'Ele vem toda a força que nos impulsiona e emana toda a energia para que possamos fazer as coisas certas, pelos caminhos do bem e que nem sempre entendemos, mas lá na frente fará todo o sentido. Obrigado meu Deus por todos os ensinamentos diários, todas as provações, todos os “nãos” de livramento, enfim, por sempre me acompanhar e perdão pelas vezes que por alguns instantes tenha duvidado da sua existência em momentos de fraqueza e desespero. Gratidão meu Senhor!

Aos meus pais, Raimundo Nonato (*in memoriam*) e Rosânia

Sem vocês o que seria de mim? Diz em Êxodo 20:12 – “Honra teu pai e tua mãe para que se prolonguem os teus dias na terra, que o Senhor, Teu Deus, Te dá.” Muitas vezes durante o meu período de crescimento e desenvolvimento, fui desobediente, irado, porém sem saber a real importância de vocês na minha vida. Hoje, adulto, e tendo uma criança aos meus cuidados, entendo por tudo o que passaram. Meu pai, já senti muito e continuo sentindo a sua falta, mas um dia nos reencontraremos, pertinho do Nosso Pai Celestial, para contemplarmos a vida eterna. Minha mãe, o quanto você foi forte e firme conosco, até porque não é fácil cuidar e NUNCA deixar faltar nada para 03 filhos... nem em relação aos bens materiais, de consumos básicos, mas principalmente, amor e educação. Obrigado minha guerreira. Eu te amo demais, e sou grato eternamente por tê-la como mãe.

Aos meus irmãos, Paulo Eduardo e Flávio Augusto

Obrigado meus irmãos pela parceria de sempre, por estarmos juntos em momentos alegres e nos difíceis... mesmo em vários momentos de discussão e brigas ditas “normais” entre irmãos, os nossos laços de sangue não se rompem. Perdemos nosso pai muito cedo, mas isso não foi motivo para que desperdiçássemos a oportunidade de buscar educação, sermos corretos e traçar os caminhos que o Senhor nos apresentou, com o suporte inestimável da nossa mãe. Graças a Deus, todos encaminhados como nossa mãe gosta de dizer. Amo vocês!!!

A minha família, Licia – minha companheira de vida e ao Joaquim – meu maior tesouro

Vocês são o meu tudo, o que eu tenho de mais precioso nessa vida! Obrigado meu amor por todo o suporte desde a época do segundo ano do meu mestrado até este momento que eu finalizo o meu doutorado... tenho certeza de que sem o seu apoio e incentivo não conseguiria. Minha companheira em todos os momentos, que me deu o meu maior tesouro, nosso filho Joaquim! Que Deus continue nos abençoando e derramando Glórias em nossas vidas para que sigamos no caminho da retidão e da integridade. Obrigado por me ajudar a educar Joaquim com princípios que Jesus nos ensinou na sua passagem terrena, dando-nos saúde e disposição para que realizemos o nosso propósito. Amo vocês com todas as minhas forças.

Aos meus avós maternos, Julio e Rosete

Além de avós, são os meus padrinhos de batismo. Pessoas que admiro muito e que são meus segundos pais neste mundo. Muito obrigado pelos ensinamentos que não estão presentes nos livros, mas àqueles que aprendemos com a vida. Exemplos de seres humanos, pacatos, tranquilos e serenos, que transmitem amor e carinho na medida certa. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora Profa. Assoc. Ana Paula Farnezi Bassi

Gratidão por tudo professora querida e exemplo de educadora. Obrigado acima de tudo por entender e ter paciência comigo principalmente por eu estar vivendo um momento profissional paralelo ao caminho da pós-graduação. Por isso, eu lhe peço desculpas publicamente por não ter me dedicado 100% como deveria e como sempre gosto de fazer quando me proponho a realizar qualquer atividade. Eu tenho pleno conhecimento que não fui um orientado tão presente que a senhora teve, mas nem por isso deixou de me prestar auxílio e/ou ser atuante durante o meu doutorado. Tenho um carinho muito especial pela senhora. Que Deus o continue abençoando sempre!!!

À minha coorientadora Prof. Dra. Marisa Ap. Cabrini Gabrielle

Sem palavras para externar a minha gratidão e carinho que possuo pela senhora. Durante os três anos da minha formação em cirurgia, foi um espelho bem forte de como operar e tratar de forma humana os pacientes. Sem dúvidas, se consigo conduzir qualquer caso hoje na minha área de trabalho, eu devo a senhora e ao programa de Residência ao qual coordena. Obrigado professora pela pessoa e profissional que sempre orienta e busca as melhores condições para que eu e outros colegas pudessem seguir na carreira cirúrgica.

Aos meus Preceptores da FOAr

Não conseguirei expressar em palavras o meu profundo agradecimento aos meus queridos professores Mário Gabrielli, Eduardo Hochuli, Valfredo Pereira, Marcelo Monnaçzi e José Scarso, que muito contribuíram para a minha formação, não somente na parte cirúrgica, mas também como ser um profissional mais humano. Os seus ensinamentos estão todos guardados na minha alma e que levarei para o resto da minha vida. Deus os abençoe sempre.

Ao meu amigo Fernando Gorla

Meu muitíssimo obrigado por tudo durante a minha passagem por Araraquara durante os três anos mais difíceis talvez, porém muito gratificantes da minha vida. Um amigo que conquistei para sempre. Conte comigo em qualquer tempo!

Aos meus amigos de infância e de vida,

Desde os primeiros passos, durante a alfabetização até hoje, graças a Deus, sempre fui rodeado de pessoas que são verdadeiros anjos os quais denominamos de amigos. Isabela, Álvaro Bruno, Anderson, Stella, Alice, Saulo, Alex, Leandro, Mércia, Ráysa, Rafaelle, Deynna, Mauricio, Alison são algumas dessas pessoas que me alegro imensamente de poder chamá-los de amigos. O tempo e a distância não influenciam. Com certeza esqueci-me de citar alguns nomes, peço desculpas, porque minha memória é falha.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –
Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Pela possibilidade de realizar um sonho de fazer pós-graduação. Obrigado pelo incentivo e obrigado mais ainda por ter feito parte do meu crescimento como um todo.

Aos colegas Vinicius Bizelli, Ana Maira Baggio, Stefani Caroline
Ferriolli, Izabela Fornazari Delamura, Luan Benetti e Edith Ramos

Pelo suporte e apoio em todas as fases deste trabalho. Vocês foram incríveis e fazem parte disso tudo também. Minha gratidão pela parceria.

À Allice Santos Cruz Veras, doutoranda da Universidade Estadual
Paulista – Presidente Prudente e a sua orientadora Professora Doutora
Giovana Rampazzo Teixeira

Pelo suporte durante a realização da análise imunoistoquímica. Muito obrigado de verdade!

AGRADECIMENTOS

Nunca é demais mais agradecer, ainda mais sabendo que sem o apoio e incentivo dos que estão ao seu redor, o ser humano não consegue galgar passos firmes para atingir seus objetivos. Além do mais, a vitória tem o sabor mais gostoso quando dividido com os que sempre torceram por você.

À Universidade Federal do Maranhão – UFMA, por ter me formado cirurgião-dentista com valores éticos, morais e humanos.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, por ter me acolhido de forma tão prazerosa fazendo sentir-me como se estivesse em casa.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, por ter me proporcionado um crescimento pessoal e profissional enorme.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista

“Julio de Mesquita Filho” Prof. Adj. Associado Wirley Gonçalves Assunção, pelo caráter, altruísmo e gentileza.

Aos professores do Departamento de Diagnóstico, **Profa. Ass. Alessandra Marcondes Aranega**, **Profa. Assoc. Daniela Ponzoni**, **Prof. Ass. Francisley Ávila Souza**, **Prof. Assoc. Idelmo Rangel Garcia Jr.**, **Prof. Ass. Leonardo Perez Faverani**, **Prof. Assoc. Osvaldo Magro Filho** em que pude desfrutar conversas, conselhos, conhecimentos sobre vários pontos que são pertinentes para a vida de qualquer pessoa.

Aos demais professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, de outras áreas, em que pude ter contato e aprender sempre mais.

Aos funcionários do serviço técnico do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, **Renato**, **Paulo**, **Marco**, **Odair**, **Dirce**, **Gilmar**, **Cleide**, **Tina**, **Joílson** e **Arnaldo** e todos aqueles que tive o prazer de conhecer e conviver. Obrigado pelo suporte e carinho.

Às funcionárias do Programa de Pós-Graduação, **Valéria**, **Cristiane** e **Lilian**, pela paciência e ajuda constante e disponibilidade ágil.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pelos cuidados e carinho que possuem com todos.

Aos demais funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, sempre tratando a todos, e não somente a mim, com muito esmero e altruísmo.

Aos meus colegas da Pós-Graduação do Mestrado em Odontologia pela amizade e companheirismo durante todos os plantões e encontros comuns da pós-graduação.

Aos meus colegas da Cirurgia e Implantodontia, pelo carinho e atenção que sempre tiveram comigo. Levo todos em meu coração.

À empresa JHS Biomateriais, pela contribuição a ciência.

Ao (Prof.º) **Léo**, fonte de inspiração e modelo, obrigado pelo incentivo em todos os seguimentos da vida, tenho que certeza de que fiz um amigo.

Aos **pacientes**, que confiaram no nosso trabalho, permitindo nosso aprimoramento técnico-cirúrgico, meus sinceros agradecimentos.

Aos **animais**, *in memoriam*, que sacrificaram as suas vidas para que buscássemos respostas para muitas perguntas e em prol de solução para os nossos problemas.

“Muitos são os planos no coração do homem, mas o que prevalece é o propósito do Senhor” (Provérbios 19:21)

Oliveira JCS. Avaliação da membrana de colágeno de peixe na regeneração óssea guiada: estudo histológico, histomorfométrico, imunoistoquímico, micro tomográfico em calotas de ratos [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2022.

RESUMO

O processo de regeneração óssea guiada é amplamente conhecido na literatura, e para que essa técnica possa ser realizada com sucesso a escolha da barreira biológica no tocante ao seu tempo de degradação e sua reação tecidual é de fundamental importância. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calotas de ratos, utilizando o princípio de osteopromoção, comparando a membrana teste de colágeno de peixe funcionalizando com hidroxiapatita com as membrana de colágeno bovino associada à hidroxiapatita e a membrana de colágeno porcino. Para o estudo foram utilizados 96 ratos Albinus Wistar, divididos em quatro grupos, sendo 24 animais para cada grupo: Grupos BG (BioGide®); CB (ColHap®); CP (colágeno de peixe) e CG (Coágulo) analisados em quatro tempos experimentais, 7, 15, 30 e 60 dias. Os resultados mostraram um perfil inflamatório maior no grupo CP em relação aos grupos BG e CB ($p < 0,05$) nos primeiros 15 dias. O grupo CP, aos 60 dias apresentou um bom potencial osteopromotor ao compará-lo com o grupo BG ($p = 0,199$) e o grupo CB demonstrou o menor desempenho osteopromotor. Na análise tridimensional, os resultados anteriores foram confirmados com o pior desempenho em relação a menor média detectado ósseo neoformado para o grupo CP de $9,560\text{mm}^3$, CB com $11,850\text{mm}^3$ e BG $14,247\text{mm}^3$ ($p < 0,05$). Conclui-se que as membranas aqui estudadas tiveram um bom comportamento biológico, e todas auxiliaram no processo de regeneração óssea guiada e que a membrana de colágeno de peixe teve um bom desempenho na osteopromoção óssea.

Palavras-chave: Membranas. Regeneração óssea. Implantes dentários

Oliveira JCS. Avaliação da membrana de colágeno de peixe na regeneração óssea guiada. estudo histológico, histomorfométrico, imunoistoquímico, micro tomográfico em calotas de ratos [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2022.

ABSTRACT

Guided bone regeneration is a widely described alveolar ridge augmentation technique that has been shown to produce excellent and reproducible results with high long-term success rates in several studies. Thus, this study aimed to evaluate the bone repair of critical size defects calavaria using an osteopromotive principle the fish collagen membrane functionalized with hydroxyapatite compare to collagen membrane associated with hydroxyapatite and porcine membrane. For the study, 96 Albinus Wistar rats were used, divided into four groups, with 24 animals for each group: Groups BG (BioGide®); CB (ColHap®); CP (fish collagen) and CG (clot) analyzed in four experimental times, 7, 15, 30 and 60 days. The results showed a higher inflammatory profile in the CP group compared to the BG and CB groups ($p < 0.05$) in the first 15 days after the surgery. The CP group, at 60 days, showed a good osteopromotor potential when compared with the BG group ($p = 0.199$) and the CB group showed the smaller osteopromotor performance. In the three-dimensional analysis, the previous results were confirmed with the worst performance in relation to the lowest mean of neoformed bone tissue for the CP group of 9.56mm^3 , CB with 11.85mm^3 and BG 14.247mm^3 ($p < 0.05$). In conclusion with the results obtained by this work, the membranes studied here had a good biological behavior, and all of them helped in the guided bone regeneration process and the fish collagen membrane performed well in bone osteopromotion.

Keywords: Membranes. Bone regeneration. Dental implants

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procedimento cirúrgico experimental, realizado após a antissepsia da região. A: tricotomia realizada e incisão em V no sentido occipito-frontal; B: calvária exposta após descolamento total do retalho; C: posicionamento da trefina para confecção do defeito de 8mm e D: defeito crítico de 8 mm realizado preservando a dura-máter.	27
Figura 2. A: Membrana de colágeno porcino BioGide® adaptada sobre o defeito ósseo; B: membrana de colágeno bovino associada à hidroxiapatita Col.Hap91® adaptada sobre o defeito ósseo; e C: membrana de colágeno de peixe associado à hidroxiapatita adaptada sobre o defeito ósseo.	27
Figura 3. Corte longitudinal obedecendo a margem de segurança ao redor de todo o defeito, separando-o ao meio para inclusão em parafina.	29
Figura 4. Cortes representativos de 6 µm de espessura de cada bloco de parafina já montados em lâminas.	29
Figura 5. À esquerda, software ImageJ utilizado para traçado de grade. À direita, grade histométrica de 130 pontos aplicada sobre a fotomicrografia histológica em um aumento da objetiva de 100x.	30
Figura 6. À esquerda, software ImageJ utilizado para contagem celular. À direita, cada célula (bolas amarelas) que toca a intersecção das linhas com as colunas contam uma célula, e cada conjunto de vasos sanguíneos (bolas vermelhas) representam a neovascularização.	30
Figura 7. Software ImageJ utilizado para calibragem da ferramenta régua na magnificação de escolha para ser realizada a histometria. Na imagem a calibragem foi realizada em uma régua na magnificação de 6,3x, a unidade de medida foi escolhida em µm.	31
Figura 8. Software ImageJ utilizado para calibragem da medida a ser realizada. Foi escolhido a opção de mediar a Área total demarcada pela ferramenta polígono.	32
Figura 9. Representação do uso da ferramenta polígono no software ImageJ para a medida da estrutura de interesse. Na imagem observamos a delimitação de uma área na qual foi observada a presença de tecido ósseo neoformado (µm).	32

Figura 10. Representação do uso do Software NRecon (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium), utilizado para a reconstrução 3D das aquisições realizadas no Micro-tomógrafo. Na imagem as linhas vermelhas delimitam a área a ser reconstruída e a linha verde indica o centro da região de interesse.	33
Figura 11. Ilustração do uso do software DataViewer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium), para a determinação do VOI. Após delimitado em uma imagem, o VOI é reproduzido igualmente para todas as outras imagens.	34
Figura 12. Representação do ROI utilizando o software CT-Analyzer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium). Após a delimitação das camadas a serem analisados, a forma arredondada do ROI é escolhida e adaptada para o tamanho da amostra.	35
Figura 13. Representação da escala de cinza utilizada (242-105) no software CT-Analyzer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium) para indicar a diferença entre osso cortical e trabecular.	35
Figura 14. Conversão das camadas escolhidas para a escala de cinza no software CT-Analyzer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium) para o cálculo dos parâmetros tridimensionais em mm.	36
Figura 15. Reconstruções panorâmicas das fotomicrografias dos grupos BG, CP, CB e GC em todos os períodos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias em um aumento de 6,3x. O defeito crítico de 8 mm de diâmetro externo, está delimitado pelo [] e indicado pelo símbolo +, os * amarelos indicam o local dos cotos ósseos	39
Figura 16. Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CP aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 25x. Na região central nota-se a presença de um tecido conjuntivo (TC) com bastante diferenciação celular e a membrana (M) íntegra.	40
Figura 17. Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CP aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e a última em 25x. Observamos tecido ósseo neoformado (TON) do coto em direção a região central, com mudança de direção das fibras e na imagem de maior aumento, notamos grandes vasos sanguíneos com células gigantes (V).	41

- Figura 18. Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CP aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 6,3x nas duas primeiras e 12,5x nas duas últimas. Observamos tecido ósseo neoformado (TON) associado a áreas de tecido osteóide e fragmentos de membrana (M) em processo de degradação. 41
- Figura 19. Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CP aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 6,3x. Observamos tecido ósseo neoformado (TON) associado a áreas de tecido osteóide e ainda resquícios de fragmentos de membrana (M) com algumas áreas entremeadas de tecido conjuntivo maduro. 42
- Figura 20. Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CB aos 07 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x. Observamos grânulos de hidroxiapatita no centro do defeito (H) e presença de células gigantes (seta) na imagem ao lado. 43
- Figura 21. Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CB aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x na primeira imagem evidenciando a integridade da membrana (M). Na segunda imagem com magnificação de 40x, notamos ilhas ósseas. 43
- Figura 22. Fotomicrografias do defeito do grupo CB aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 6,5x nas duas imagens, mostrando maior neoformação óssea (TON) e presença ainda de partículas de hidroxiapatita. 44
- Figura 23. Fotomicrografias do defeito do grupo CB aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x nas duas primeiras imagens, demonstrando fechamento do defeito e outro espécime com presença de tecido conjuntivo (sem fechamento total). Na última imagem, com aumento de 25x, presença de grânulos de hidroxiapatita no final do processo de reparo ósseo. 44
- Figura 24. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BG aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Na região do coto (C) nota-se a presença de um tecido conjuntivo (TC) e a membrana (M) íntegra, envolvendo as duas partes. No centro do defeito, nota-se a nitidamente a presença da membrana (M) e um tecido conjuntivo (TC) bem celularizado. 45

- Figura 25. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BG aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Próximo aos cotos (CO), nota-se a área de tecido ósseo neoformado (TON) envolto por tecido conjuntivo (TC) altamente vascularizado (V). No centro do defeito a membrana (M) aparece de maneira íntegra envolvendo todo o defeito. 46
- Figura 26. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BG aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Na região do coto ósseo, nota-se a presença de área de tecido ósseo neoformado (TON) envolto por grandes vasos sanguíneos (V). No centro do defeito, área de tecido ósseo neoformado (TON) aparece envolto por tecido conjuntivo (TC). 46
- Figura 27. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BG aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. O coto ósseo (C) já se confunde com a área total de tecido ósseo neoformado (TON), sendo possível observar grandes vasos sanguíneos (V) e o tecido ósseo ativo pela presença de osteócitos viáveis. No centro do defeito, grande área de tecido ósseo neoformado (TON) é visualizada, garantindo quase o fechamento total do defeito. 47
- Figura 28. Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo GC aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Um grande tecido de granulação (TG), e a presença de vasos sanguíneos (V), são observados. 48
- Figura 29. Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo GC aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Nota-se um tecido conjuntivo (TC) levemente vascularizado, vasos sanguíneos (V) distribuídos pelo defeito e pequenas áreas de tecido ósseo neoformado (TON). 49
- Figura 30. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Tecido conjuntivo (TC) mais organizado com pequenas áreas de tecido ósseo neoformado (TON) envolvidas por grandes aglomerados celulares (células osteoprogenitoras). 49

Figura 31. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Tecido conjuntivo organizado (TC), áreas de tecido ósseo neoformado (TON), espalhadas pelo defeito e grandes vasos sanguíneos (V), próximos a áreas de neoformação óssea. 50

Figura 32. Gráfico demonstrando as comparações das médias e desvio padrão intra e inter grupos para a análise de células inflamatórias (linfócitos) no período de 7 e 15 dias. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas significantes inter grupos para o período de 15 dias, o * demonstra se houve diferença estatística significativa intra grupo no período de 7 para 15 dias. Nas fotomicrografias ao lado realizadas em uma magnificação de 100x, as setas amarelas (↑) indicam as células (linfócitos) e os * os vasos sanguíneos. 51

Figura 33. Gráfico demonstrando as comparações das médias e desvio padrão intra e inter grupos para a análise da quantidade de vasos sanguíneos no período de 7 e 15 dias. As letras minúsculas demonstram diferença estatística significativa para o período de 15 dias, não houve diferença estatística para o período de 7 dias. O * demonstra se houve diferença estatística significativa intra grupo no período de 7 para 15 dias. Nas fotomicrografias ao lado realizadas em uma magnificação de 100x, as setas amarelas (↑) indicam as células (linfócitos) e os * os vasos sanguíneos. 52

Figura 34. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão da área de osso neoformado de todos os grupos (BG, CP, CB e CG) para os tempos experimentais de 7,15,30 e 60 dias. As letras minúsculas demonstram diferença estatística significativa inter grupos para os tempos de 30 e 60 dias, nos períodos de 7 e 15 dias, não houve diferença estatística entre os grupos analisados. 53

Figura 35. Gráficos demonstrando a média e o desvio padrão do (A)BV, (B)BV/TV, (C)Tb.th, (D)Tb.Sp, (E)Tb.n, (F)Po.tot no período de 60 dias para os grupos BG, CP e CB. As diferenças estatísticas significantes entre os grupos estão representadas pelas letras minúsculas diferentes (a, b, c). 55

Figura 36. Reconstrução axial do defeito crítico na calota dos animais após 60 dias de reparo ósseo, para os grupos BG, CB, e CP. Nota-se a maior área de neoformação óssea para o grupo BG, acompanhado do grupo CB (com presença de grânulos de hidroxiapatita) e por último o grupo CP. 55

Figura 37. Fotomicrografias dos grupos BG, CP e CB, durante os períodos de 56
reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x, evidenciando as
imunomarcações de osteopontina (setas amarelas).

Figura 38. Fotomicrografias dos grupos BG, CP e CB, durante os períodos de 57
reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x, evidenciando as
imunomarcações de osteocalcina (setas amarelas).

LISTA DE ABREVIATURAS

%	porcento
µm	microlitro
µm	micrômetro
3D	tridimensional
AON	área do osso neoformado
BG	Bio-gide®
BV	volume ósseo
BV/TV	porcentagem de volume ósseo
CB	colágeno bovino
CG	coágulo
CP	colágeno peixe
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
e-PTFE	politetrafluoretileno expandido
g	grama
h	horas
hAMSC	célula tronco mesenquimal
HE	hematoxicilina e eosina
kg	quilograma
ml	mililitro
ml/kg	mililitro por quilograma
mm	milímetro
mm ³	milímetro cúbico
°C	graus Celsius
OC	osteocalcina
OP	osteocalcina
Po.tot	porcentagem da porosidade óssea total
PTFE	politetrafluoretileno
ROI	região de interesse
Tb.N	número de trabéculas ósseas
Tb.S	separação do trabeculado
Tb.th	espessura do trabeculado ósseo
UI	unidade internacional

VOI volume de interresse

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVO	24
3 MATERIAL E MÉTODO	25
3.1 Ética e desenho do estudo	25
3.2 Composição da amostra	25
3.3 Fase cirúrgica	26
3.4 Processamento histotécnico e micro-tc	28
3.5 Análises histológica e histomorfométrica	29
3.6 Análise por micro-tc	33
3.7 Análise imunoistoquímica	36
3.8 Análise estatística	37
4 RESULTADOS	38
4.1 Análise histológica (morfologia)	38
4.2 Análise histométrica	50
4.2.1 Perfil inflamatório	50
4.2.2 Área de osso neoformado (AON)	52
4.3 Análise de micro-tc	54
4.4 Análise imunoistoquímica	55
5 DISCUSSÃO	58
6 CONCLUSÃO	62
REFERENCIAS	63
ANEXOS	67

1 INTRODUÇÃO*

A regeneração óssea guiada é uma técnica de aumento do rebordo alveolar amplamente descrita que demonstrou produzir resultados excelentes e reprodutíveis com altas taxas de sucesso a longo prazo em diversos estudos [1-3]. A partir da criação de um espaço, e por meio do uso de membranas que tem a função de barreira, tem-se a preservação do coágulo sanguíneo, prevenindo a invasão de tecidos moles – tecido conjuntivo fibroso e promovendo a neoformação óssea na região [4-6].

Esse conceito que auxilia um ganho de volume ósseo para a possibilidade de reabilitação bucal por meio da instalação de implantes osseointegráveis e posterior confecção de próteses tem sido usado por mais de 40 anos, sendo principais indicações do uso de membranas biológicas: correção de rebordos edêntulos ou defeitos residuais [7], alvéolos pós exodontias [8], deiscências e fenestrações após a instalação de implantes mediatos e imediatos [9].

Existem basicamente dois grandes grupos de membranas: não absorvíveis (PTFE - politetrafluoretileno e e-PTFE - politetrafluoretileno expandido) e absorvíveis (polímeros naturais - a base de colágeno e os poliésteres sintéticos alifáticos), sendo que algumas características devem ser levadas em consideração no momento da escolha da membrana, tais como: biocompatibilidade, porosidade celular, capacidade de criar espaço, integração tecidual, “degradabilidade”, propriedades mecânicas e características de manuseio [10-12]. A principal vantagem das membranas absorvíveis é justamente o fato de não haver necessidade de um segundo tempo cirúrgico para a remoção, por isso a maior parte das pesquisas tem focado no desenvolvimento desse tipo de material [13-14].

Atualmente, as membranas degradáveis mais utilizadas são as de colágeno ou de poliglicolídeo e/ou polilactídeo ou copolímeros dos mesmos [15]. O colágeno é o principal componente da matriz extracelular com propriedades biológicas desejáveis e baixa antigenicidade [16]. Os colágenos são uma família de diferentes tipos de proteínas estruturais encontradas em muitos tecidos humanos, como pele, vasos sanguíneos e ossos. O colágeno pode ser sintetizado por muitas células especializadas no corpo humano, dependendo da localização; os fibroblastos são responsáveis pela produção de colágeno no tecido conjuntivo enquanto os osteoblastos pelo osso [11-17]. Nesse sentido, a mais utilizada e tida como referência no mercado é derivada da derme de suínos e não reticulada comercialmente

* Normalização segundo o periódico Membranes (Anexo B)

conhecida como Bio-Gide® (Geistlich) porém apresenta custo elevado o que muitas vezes inviabiliza o seu uso, além de apresentar um processo de degradação rápido. [18-19], no tocante a grandes reconstruções tridimensionais.

Assim, a indústria tem se esforçado para testar e oferecer outras opções de membranas com potencial de ação semelhante ou melhor que a Bio-Gide® (Geistlich), também derivada de colágeno; dentre elas as feitas de colágeno bovino e colágeno de peixe. O colágeno bovino embora mais comum ainda não tem muitas referências de pesquisas que validem sua utilização na fabricação de membranas, e o colágeno de peixe é uma nova fonte de obtenção de produto [14]. Em suma, tem havido interesse em fontes de colágeno não mamífero, principalmente em colágeno de peixes, como o de tubarão e salmão, pois é conhecido por ter baixo risco de transmissão de doenças infecciosas para humanos do que o colágeno bovino [20-21].

Nos últimos anos, o uso de colágeno de peixe como um biomaterial cada vez mais valioso tem chamado considerável atenção de pesquisadores biomédicos, devido às suas propriedades físico-químicas aprimoradas, estabilidade e resistência mecânica, biocompatibilidade e biodegradabilidade. O colágeno de peixe é um polímero natural biocompatível que tem uma boa função de promover a formação de novos tecidos. Colágeno de vários tipos de peixes tem sido proposto para uso como membrana em regeneração óssea guiada [22].

Baseado nesses princípios, surge uma alternativa na regeneração óssea guiada com a possibilidade de utilização da membrana de colágeno extraído do peixe. Um trabalho inicial já foi realizado quanto aos testes de citotoxicidade com o colágeno de peixe o qual possui biocompatibilidade e não apresentou nenhum efeito citotóxico para cultura celular de hAMSC [23]. Tendo em vista estas características promissoras do colágeno de peixe, faz-se pertinente um estudo para avaliar o potencial desse tipo de membrana na regeneração óssea guiada.

2 OBJETIVO

Avaliar o processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calotas de ratos, comparando a membrana porcina, membrana de colágeno bovino associada à hidroxiapatita e a membrana de colágeno de peixe associada à hidroxiapatita, por meio de estudo histomorfométrico, imunoistoquímico e micro tomográfico.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Ética e desenho do estudo

Para a realização dessa pesquisa, foi realizado um estudo *in vivo*, comparativo, cego e randomizado, sendo submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no uso Animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, com o processo FOA #0100-2021. O protocolo de manuseio dos animais em pesquisas experimentais baseou-se nas normas preconizadas pelo “Guide to the care and use of experimental animal” [24] além das diretrizes da Arrive Guidelines [25]. (ANEXO A)

3.2 Composição da amostra

Um total de 96 ratos (*Rattus norvegicus*, Wistar) foram utilizados nesta pesquisa, machos, adultos (3 a 4 meses), com aproximadamente 200g a 300g, os quais foram divididos em 4 grupos (n = 6 por grupo), submetidos à eutanásia em quatro momentos do experimento, aos 7, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia. Estes animais foram mantidos em gaiolas, e alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água *ad libitum* no Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba– UNESP.

Sendo assim, em cada animal foi realizado um defeito ósseo crítico na calvária (8 mm), conforme a divisão a seguir:

- **Grupo colágeno de peixe associada à hidroxiapatita - CP (Grupo Experimental 1) – n=24** em que o defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito foi colocada uma membrana de colágeno hidroxiapatita de peixe.
- **Grupo colágeno bovino associada à hidroxiapatita - CB (Col.Hap91® - Grupo Controle Positivo 1) – n=24** em que o defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno hidroxiapatita bovina.
- **Grupo colágeno porcino - BG (Bio-Gide®, Controle Positivo 2) – n=24** em que o defeito ósseo crítico será preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno porcino.

- **Grupo coágulo – GC (Controle Negativo) – n=24** em que o defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo sem o recobrimento do defeito.

É importante ressaltar que acrescentamos o grupo de colágeno bovino associada a hidroxiapatita para que pudéssemos comparar o desempenho do grupo experimental 1 visto que ambos são membranas associadas com hidroxiapatita, que permite a membrana ser mais resistente em termos mecânicos além de aumentar o tempo de degradação dela.

3.3 Fase cirúrgica

Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de doze horas e submetidos à sedação por meio da administração via intramuscular, com cloridrato de ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado à xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil), na dosagem de 50 a 70 mg/Kg e 5 a 10mg/Kg, respectivamente. Um rigoroso protocolo asséptico foi adotado, incluindo a esterilização do instrumental utilizado, delimitação da área a ser operada com campos estéreis, uso de aventais e luvas cirúrgicas estéreis. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Em seguida foi realizada a tricotomia na região da calvária, antissepsia com polivinil pirrolidona iodo degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado ao PVPI tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto) e aposição de campos estéreis.

Uma incisão em forma de V foi realizada no sentido occipito-frontal de aproximadamente 2 (dois) cm, com lâmina nº 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha) (Figura 1A) e o descolamento total do retalho com descolador tipo Molt (Hu-Friedy, Alemanha) (Figura 1B). Em seguida com auxílio de broca trefina de 7mm de diâmetro interno (3i Implant innovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA) acoplada em baixa-rotação sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), foi confeccionado um defeito cirúrgico crítico de 8 mm de diâmetro(26), na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital, mantendo-se a integridade da dura-máter (Figuras 1C e D).

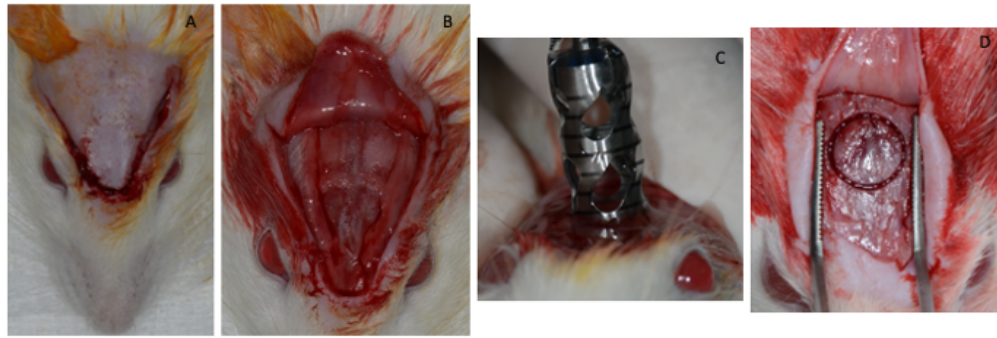


Figura 1. Procedimento cirúrgico experimental, realizado após a antisepsia da região. **A:** tricotomia realizada e incisão em V no sentido occipito-frontal; **B:** calvária exposta após descolamento total do retalho; **C:** posicionamento da trefina para confecção do defeito de 8mm e **D:** defeito crítico de 8 mm realizado preservando a dura-máter.

De acordo com os tratamentos propostos os defeitos foram preenchidos somente com coágulo sanguíneo e os demais grupos preenchidos com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno porcino (Grupo Bio-Gide® – n=24), ou com uma membrana de colágeno bovino associada à hidroxiapatita (Grupo Col.Hap91® - n=24) ou com a membrana de colágeno de peixe associada à hidroxiapatita (CHP – n=24) (Figura 2).

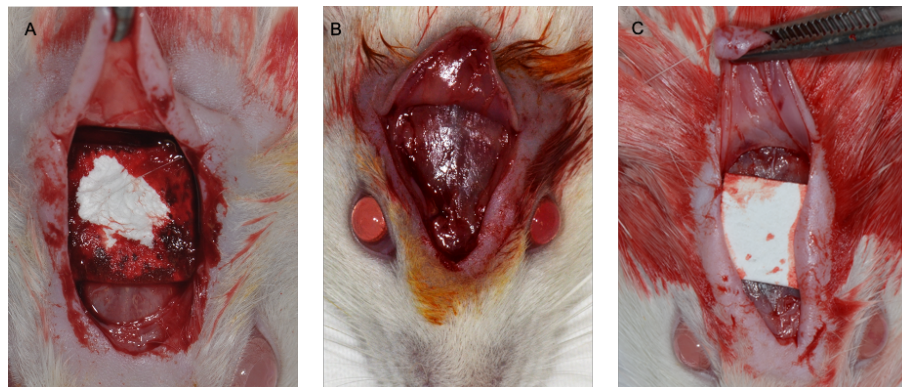


Figura 2. **A:** Membrana de colágeno porcino BioGide® adaptada sobre o defeito ósseo; **B:** membrana de colágeno bovino associada à hidroxiapatita Col.Hap91® adaptada sobre o defeito ósseo; e **C:** membrana de colágeno de peixe associada à hidroxiapatita adaptada sobre o defeito ósseo.

Finalizando o procedimento, os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados em planos empregando-se fio reabsorvível (ácido polilático – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) no plano profundo e fio monofilamentar (Nylon

5.0, Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo.

No pós-operatório imediato cada animal recebeu uma dose única intramuscular de 0,1mg/ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento com ração e água *ad libitum*.

3.4 Processamento histotécnico e micro-tc

As calotas cranianas dos ratos, obtidas nos tempos preconizados de 07, 15, 30 e 60 dias, foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 20% por 05 semanas, desidratadas em sequência de álcoois e diafanizadas. Posteriormente, as calvárias foram cortadas ao meio no sentido longitudinal, separando o defeito ósseo (Figura 3). As peças obtidas foram incluídas em parafina, e cortadas em cortes semiseriados de 6µm de espessura (Figura 4). De cada peça, 10 lâminas foram obtidas, as quais foram destinadas à coloração de hematoxilina & eosina (HE) para a confecção das análises histológicas e histomorfométricas. Apenas no período de eutanásia de 60 dias, as peças foram mantidas em álcool 70%, após serem fixadas em formaldeído 10% durante 48 horas e lavadas em água corrente por 24 horas. Foram analisadas no sistema de micro-tc Skyscan 1174 (Bruker, Kontich, Belgium) e, posteriormente, tratadas da mesma maneira que as outras peças, obtendo-se as lâminas com a coloração HE.



Figura 3. Corte longitudinal obedecendo a margem de segurança ao redor de todo o defeito, separando-o ao meio para inclusão em parafina.



Figura 4. Cortes representativos de 6 µm de espessura de cada bloco de parafina já montados em lâminas.

3.5 Análises histológica e histomorfométrica

Após a obtenção das lâminas, estas foram avaliadas histologicamente quanto a capacidade de neoformação óssea, presença de infiltrado inflamatório, formação de tecido conjuntivo, absorção e/ou manutenção dos materiais estudados. As amostras foram codificadas de maneira que somente a orientadora sabia a quais grupos pertenciam. Um único examinador realizou as análises.

A partir dos cortes semiseriados em cada período de eutanásia serem coradas com HE (Merck & Co., Inc.), as mensurações foram realizadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas ImageLab 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontario, Canada). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem posteriormente analisadas e foram projetadas na tela de um monitor Samsung (SyncMaster 3Ne, 15 polegadas).

O perfil inflamatório das membranas foi realizado a partir da quantificação de células inflamatórias (com ênfase em linfócitos) e vasos sanguíneos. Para isso, foram realizadas fotomicrografias em um aumento de 100x, das quais 3 imagens eram realizadas por secção histológica: a primeira, ao centro do defeito; a segunda, à direita; e a terceira, à esquerda; sendo que 2 secções histológicas por animal foram escolhidas das amostras obtidas nos tempos experimentais de 7 e 15 dias para os grupos CHP, Col.Hap.91[®] e Bio-Gide[®], totalizando 72 imagens. Após a obtenção das imagens, no software Image J, uma grade contendo 130 pontos foi inserida em cada imagem, e cada célula com característica linfocitária (mononucleares) que tocasse o ponto era contada; para os vasos sanguíneos, o conjunto de pontos inseridos dentro do mesmo vaso era quantificado (Figuras 5 e 6).

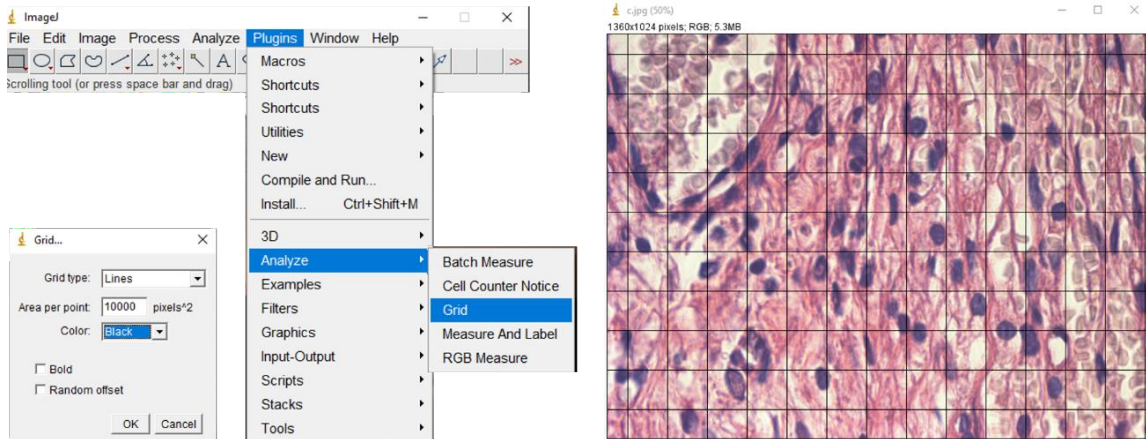


Figura 5. À esquerda, software ImageJ utilizado para traçado de grade. À direita, grade histométrica de 130 pontos aplicada sobre a fotomicrografia histológica em um aumento da objetiva de 100x.

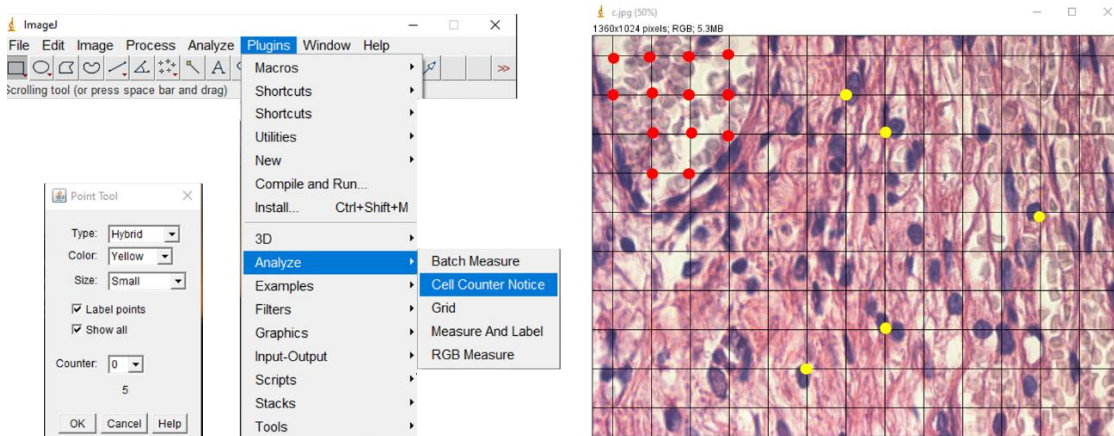


Figura 6. À esquerda, software ImageJ utilizado para contagem celular. À direita, cada célula (bolas amarelas) que toca a intersecção das linhas com as colunas contam uma célula, e cada conjunto de vasos sanguíneos (bolas vermelhas) representam a neovascularização.

A quantidade de osso neoformado foi quantificada a partir da reconstrução panorâmica das secções histológicas em um aumento de 6.3x. Com o software ImageJ, a ferramenta régua foi utilizada para a calibragem de acordo com a magnificação escolhida para a histometria. A distância conhecida, calibrada em 1 e a unidade de medida em micrômetros (μm) (Figura 7). Após a calibragem da régua, a ferramenta polígono é utilizada e habilitada para contagem da área após a imagem estar aberta no software (Figura 8). Com a imagem aberta, a ferramenta do polígono é executada, delimitando a área a ser contada, os resultados são salvos e somados ao final do processo, representando a quantidade de neoformação óssea (Figura 9). Fotomicrografias foram realizadas próximas ao coto ósseo e no centro do defeito em um

aumento de 40x. Para isso, no software ImageJ, utilizando a ferramenta Polígono, a área de osso neoformado foi dimensionada para todos os grupos em todos os períodos experimentais.

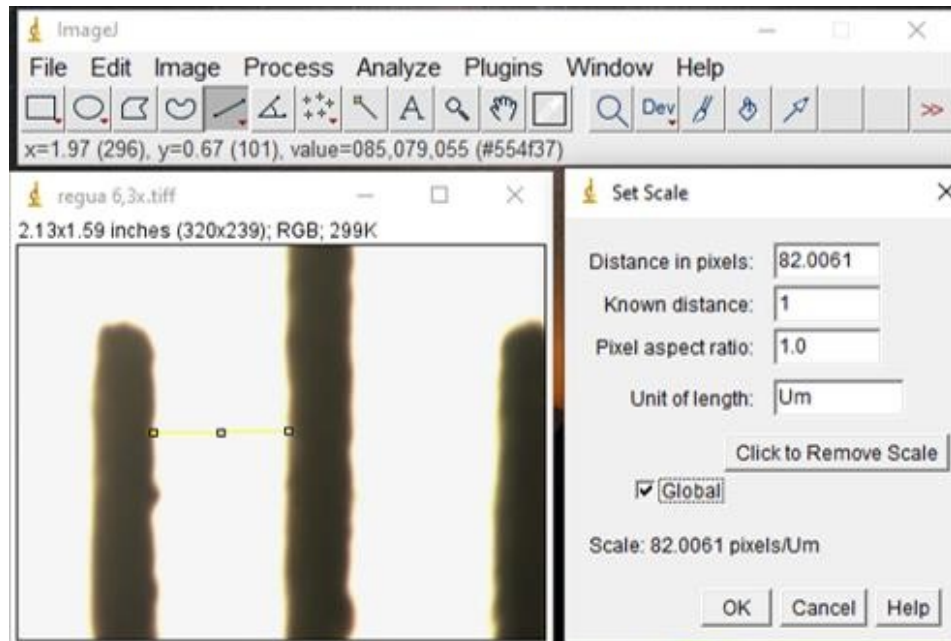


Figura 7. Software ImageJ utilizado para calibragem da ferramenta régua na magnificação de escolha para ser realizada a histometria. Na imagem a calibragem foi realizada em uma régua na magnificação de 6,3x, a unidade de medida foi escolhida em μm .

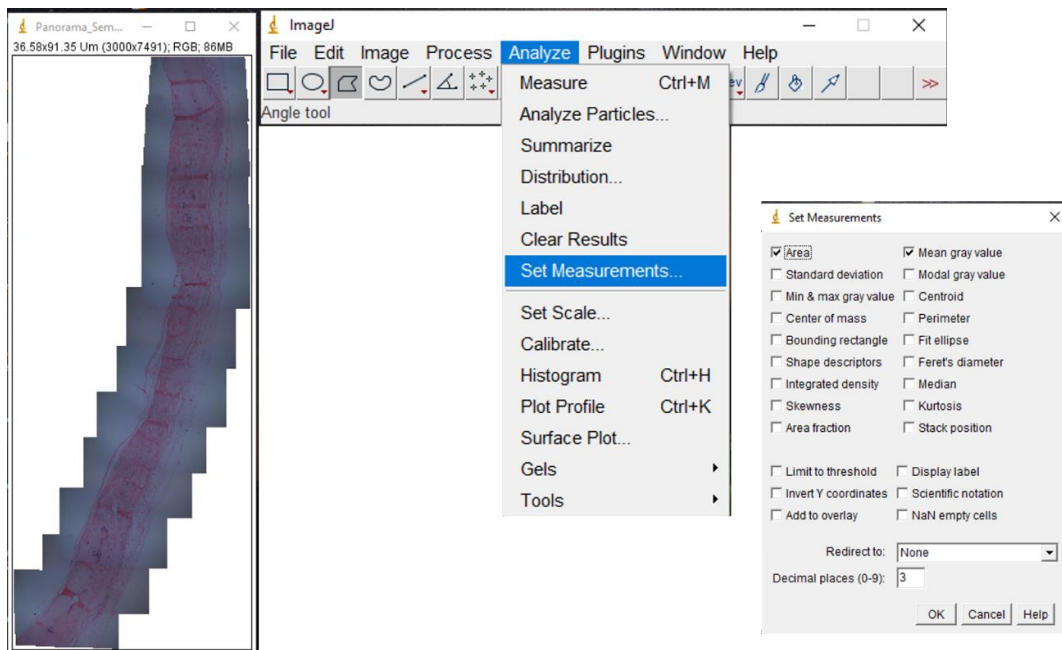


Figura 8. Software ImageJ utilizado para calibragem da medida a ser realizada. Foi escolhido a opção de medir a Área total demarcada pela ferramenta polígono.

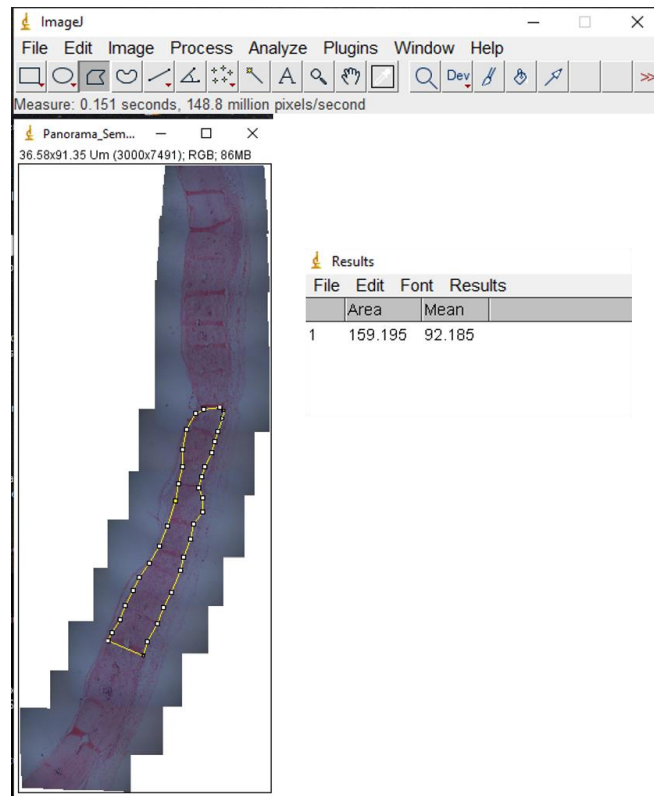


Figura 9. Representação do uso da ferramenta polígono no software ImageJ para a medida da estrutura de interesse. Na imagem observamos a delimitação de uma área na qual foi observada a presença de tecido ósseo neoformado (μm).

3.6 Análise por micro-tc

Após a fixação das calvárias em formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, os espécimes obtidos no período de eutanásia de 60 dias, foram mantidos em álcool 70%, e submetidos à avaliação em micro-tomógrafo computadorizado Skyscan 1174 (Bruker, Kontich, Belgium). Os parâmetros utilizados foram: tamanho do pixel 11,87 μm , 50 kVp, filtro de 0,5mm de alumínio, rotação 0.6° e rotação do arco de 180°.

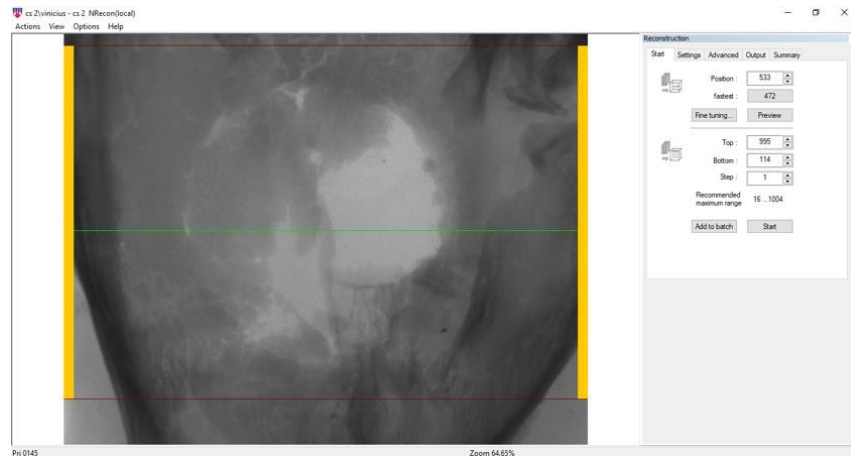


Figura 10. Representação do uso do Software NRecon (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium), utilizado para a reconstrução 3D das aquisições realizadas no Micro-tomógrafo. Na imagem as linhas vermelhas delimitam a área a ser reconstruída e a linha verde indica o centro da região de interesse.

Após a digitalização, as imagens obtidas foram importadas para o NRecon Reconstruction Software (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium) para a reconstrução tridimensional (3D) das calvárias na escala de cinza, na qual as linhas vermelhas delimitam a área a ser reconstruída e a linha verde o centro da região de interesse (Figura 10). Após a obtenção das imagens em 3D, o Software DataViewer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium) foi utilizado para a determinação do volume de interesse (VOI), que foi padronizado para todas as imagens, sendo que todos foram salvos em uma visão coronal (Figura 11).

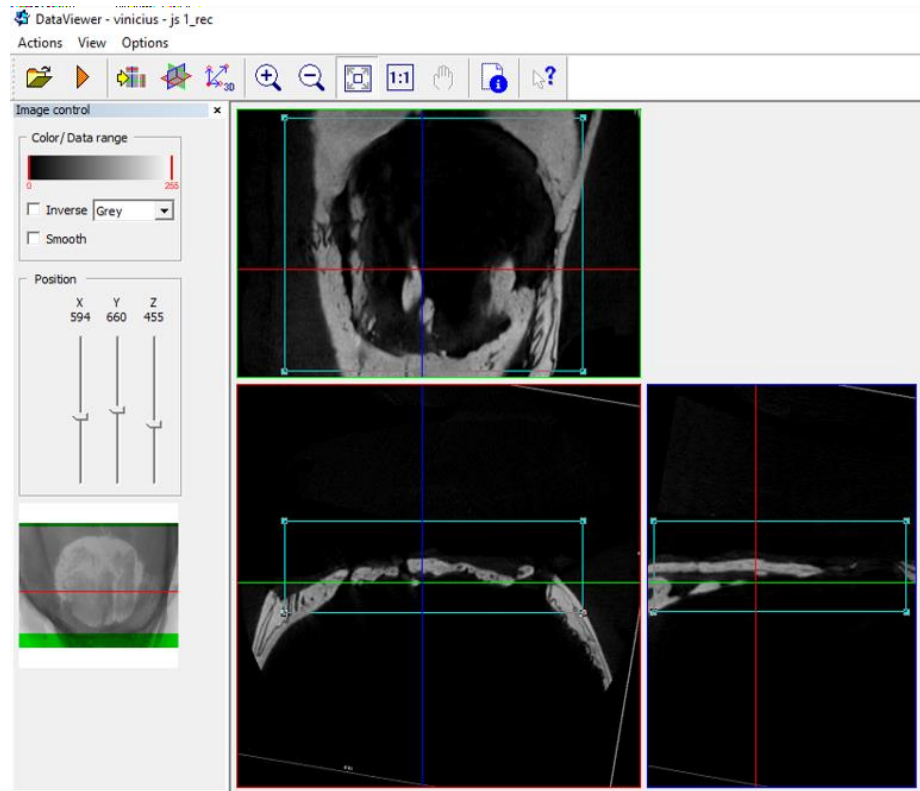


Figura 11. Ilustração do uso do software DataViewer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium), para a determinação do VOI. Após delimitado em uma imagem, o VOI é reproduzido igualmente para todas as outras imagens.

Os cortes obtidos foram importados para o Software CT-Analyzer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium). Nas imagens obtidas, foram avaliados parâmetros morfométricos como volume ósseo (BV), porcentagem de volume ósseo (BV/TV), e espessura do trabeculado ósseo (Tb.th), número de trabéculas ósseas (Tb.N), separação do trabeculado (Tb.Sp) e porcentagem da porosidade óssea total (Po.tot) (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium). Para a determinação da região de interesse (ROI) foi utilizada a ferramenta Round devido a morfologia arredondada dos defeitos, sendo essa também padronizada para todas as reconstruções (9,74x9,74) (Figura 12). Logo após, foi utilizado um limite da escala de cinza de 105 a 242 em um intervalo de 100 camadas (Figura 13). As imagens foram então convertidas para a escala de cinza para o cálculo dos parâmetros tridimensionais em milímetros (mm), realizado pelo próprio software (Figura 14).

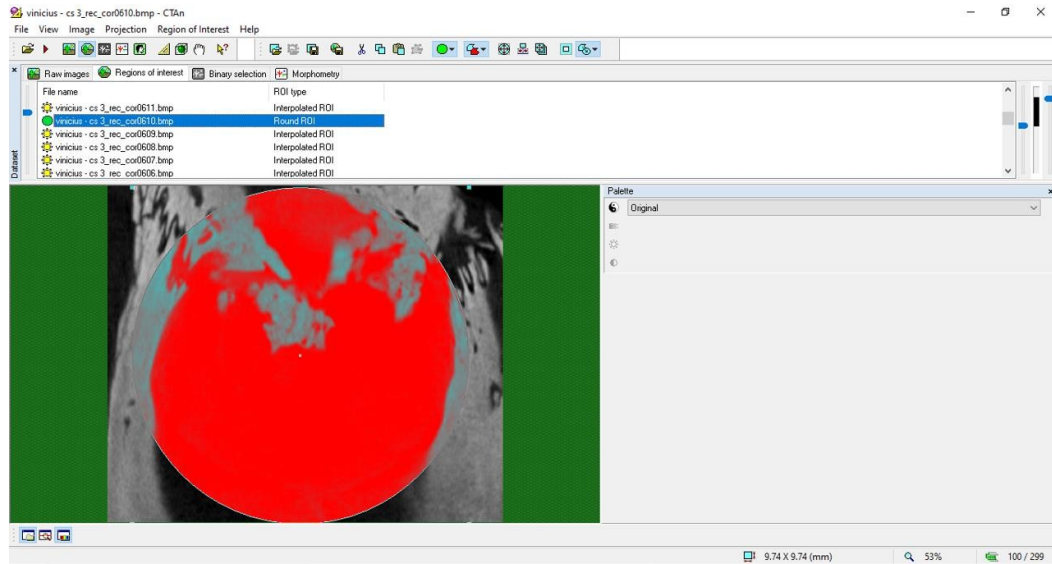


Figura 12. Representação do ROI utilizando o software CT-Analyzer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium). Após a delimitação das camadas a serem analisados, a forma arredondada do ROI é escolhida e adaptada para o tamanho da amostra.

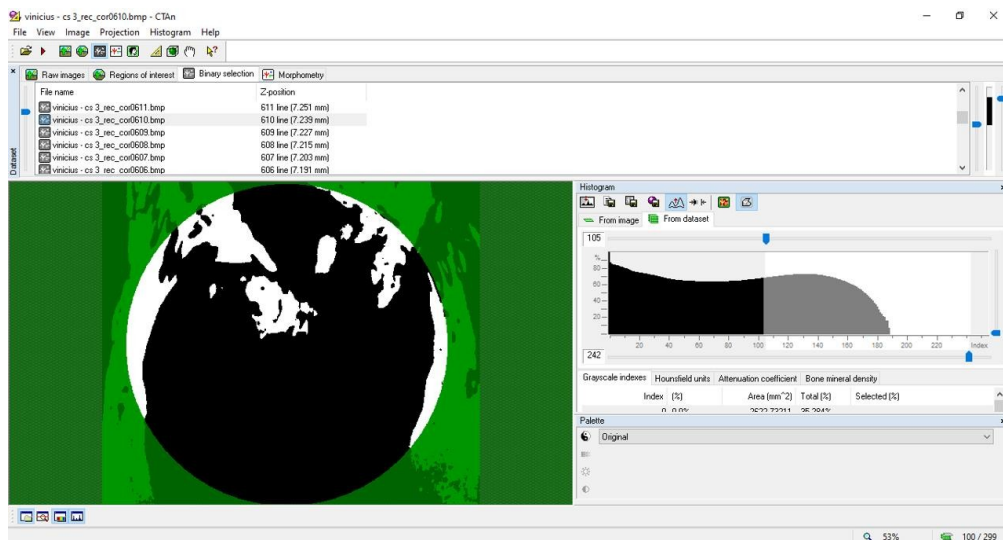


Figura 13. Representação da escala de cinza utilizada (242-105) no software CT-Analyzer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium) para indicar a diferença entre osso cortical e trabecular.

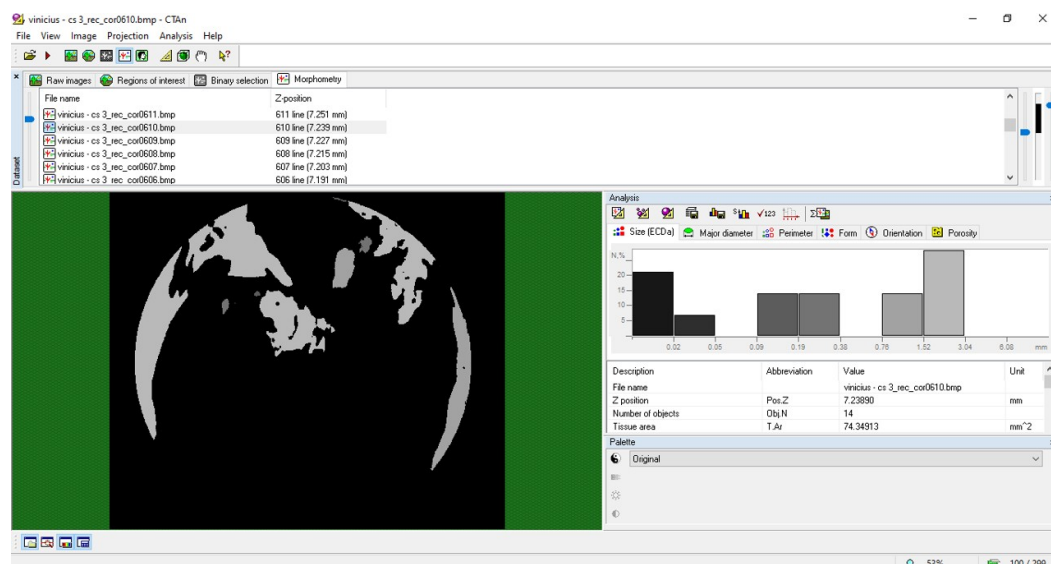


Figura 14. Conversão das camadas escolhidas para a escala de cinza no software CT-Analyzer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium) para o cálculo dos parâmetros tridimensionais em mm.

3.7 Análise imunoistoquímica

A imunoistoquímica foi realizada a partir das lâminas obtidas dos cortes semiseriados em cada período de eutanásia, por meio da detecção pela imunoperoxidase. A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. Posteriormente, metade das lâminas obtidas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0) e o bloqueio da biotina endógena através de leite desnatado. Os anticorpos primários foram contra osteocalcina (OC) (Santa Cruz Biotechnology) e osteopontina (OP) (Santa Cruz Biotechnology).

Foi utilizado o anticorpo secundário biotilado anti-cabra produzido em burros (Jackson Immunoresearch Laboratories), o amplificador foi a Avidina e Biotina (Vector laboratories) e a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno. Após a revelação das reações com o cromógeno, foi feita a contra-coloração dos cortes histológicos utilizando a hematoxilina de Harris. Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão destas proteínas semi-quantitativamente pela atribuição de diferentes “scores” de acordo com o número de células imunomarcadas no processo de reparo ósseo. A análise foi realizada em microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) e a intensidade das imunomarcações foi determinada semiquantitativamente, com escores de 1 a 4, sendo 1 para ausência de imunomarcção e 4 para marcação intensa.

3.8 Análise estatística

Os dados obtidos durante as análises histomorfométricas e Micro-TC foram submetidos a um teste de normalidade para avaliação da distribuição das amostras (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$). Após a confirmação da distribuição normal das amostras, para as análises histomorfométricas, o teste estatístico ANOVA 2-fatores e o pós-teste de Tukey foram utilizados para a comparação das médias obtidas. Para as análises de Micro-TC, o teste estatístico ANOVA 1-fator e o pós teste Holm-Sidak foram utilizados para a comparação das médias obtidas. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise histológica (morfologia)

A partir de reconstruções panorâmicas (Figura 15) das fotomicrografias realizadas em um aumento de 6,3x foi realizada a descrição histológica com a confirmação das estruturas encontradas nos maiores aumentos.

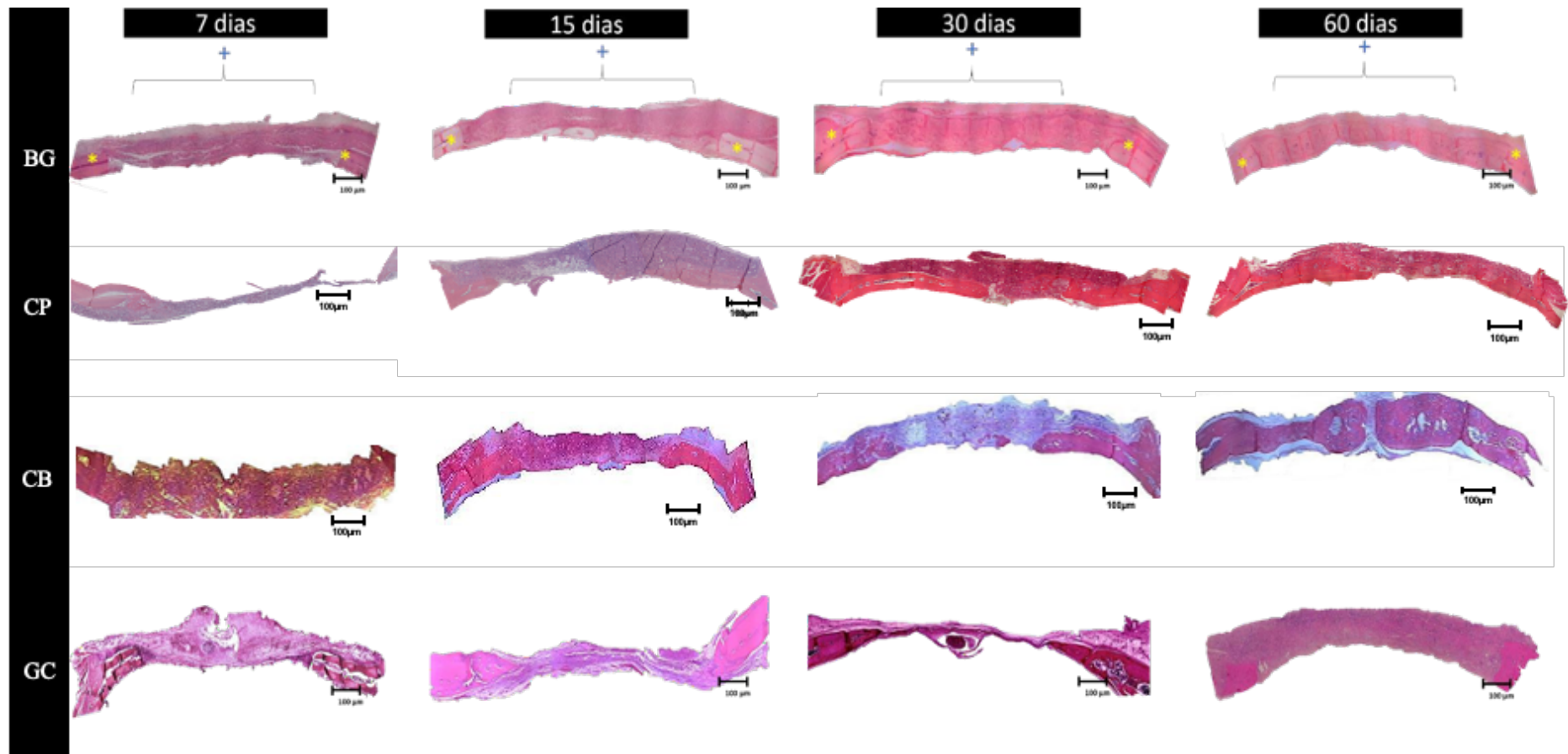


Figura 15. Reconstruções panorâmicas das fotomicrografias dos grupos BG, CP, CB e GC em todos os períodos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias em um aumento de 6,3x. O defeito crítico de 8 mm de diâmetro externo, está delimitado pelo [] e indicado pelo símbolo +, os * amarelos indicam o local dos cotos ósseos.

Grupo colágeno de peixe + hidroxiapatita (CP)

7 dias: a membrana encontra-se íntegra, recobrindo todo o defeito. Presença de coágulo sem organização na região abaixo em direção ao centro, juntamente com áreas de tecido de granulação ricamente vascularizado e celularizado com deposição de fibras dando início a granulação. Inicia-se invasão celular na membrana e no meio, aparecem pequenas ilhas iniciando o processo de neoformação óssea, o que demonstra permeabilidade da membrana. Em algumas lâminas, na área central, aparecem tecidos com diferenciação sugerindo pontes de tecido osteóide (Figura 16).

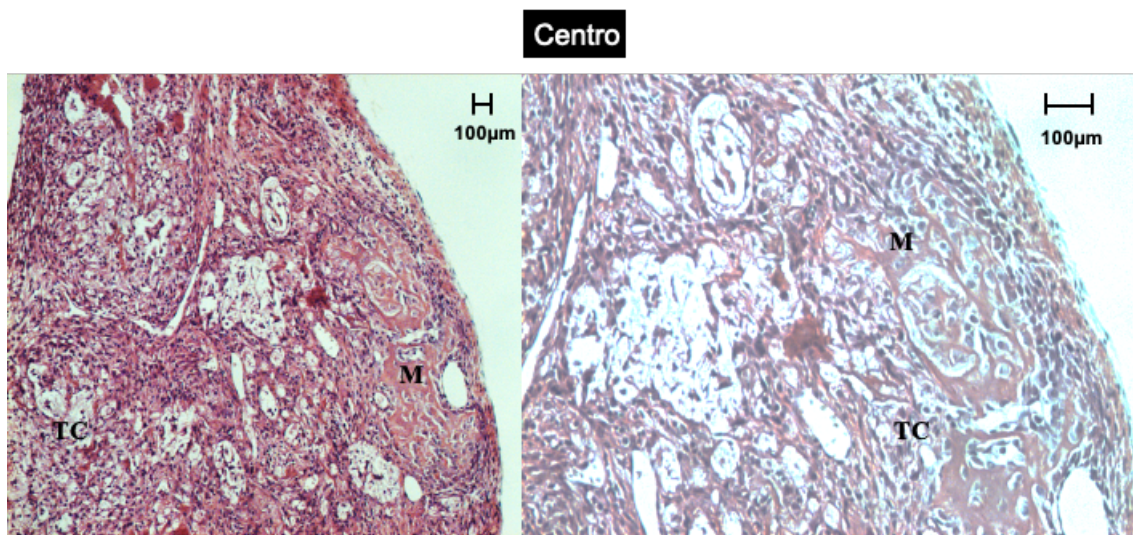


Figura 16. Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CP aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 25x. Na região cnetral nota-se a presença de um tecido conjuntivo (TC) com bastante diferenciação celular e a membrana (M) íntegra.

15 dias: observa-se organização das fibras (feixes) do tecido de granulação apresentando-se mais paralelos, na mesma direção. A membrana ainda se encontra envolvida por periósteo, isolada do meio com bastante tecido celularizado. Encontramos pontes ósseas a partir do próprio osso já existente. No centro do defeito com a membrana, temos muitas células, vasos sanguíneos, demonstrando maturação lenta e fibras ainda dispostas de forma irregular. Evidenciamos uma neoformação óssea do coto em direção ao centro do defeito com periósteo espesso, bastante celularizado e em algumas áreas com reação menos intensa com menos células inflamatórias. Fibras iniciando um paralelismo, indicando um início de maturação com presença de células gigantes (macrófagos) (Figura 17).

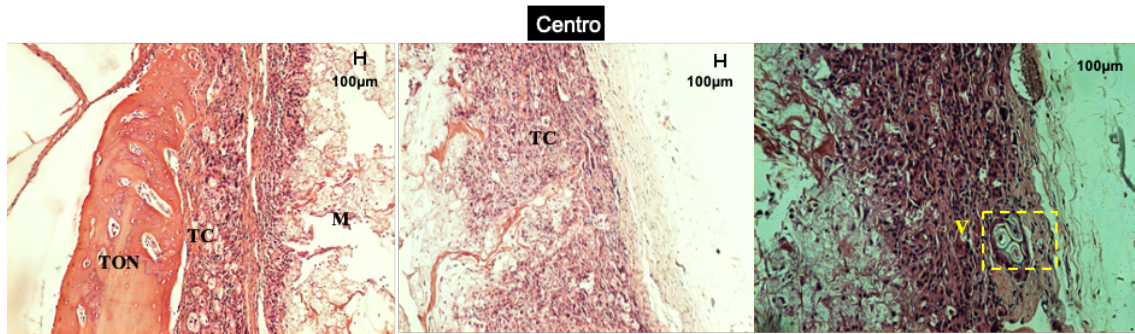


Figura 17. Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CP aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e a última em 25x. Observamos tecido ósseo neoformado (TON) do coto em direção a região central, com mudança de direção das fibras e na imagem de maior aumento, notamos grandes vasos sanguíneos com células gigantes (V).

30 dias: evidencia-se formação de tecido ósseo na região central do defeito com resíduo de membrana, em processo de degradação, perdendo função como barreira na regeneração óssea. Presença ainda de muito tecido celularizado (mais maduro) na periferia, porém com tecido ósseo neoformado. Nota-se fragmentos da membrana dispersos no meio do defeito, em processo de degradação, com neoformação de vasos sanguíneos na região central. Em algumas áreas, com organização de tecido de granulação, iniciando possivelmente formação óssea com disposição de fibras na mesma direção (ilhas de neoformação óssea). Formação de tecido ósseo do coto em direção ao centro com alguns pontos com maior maturação (Figura 18).

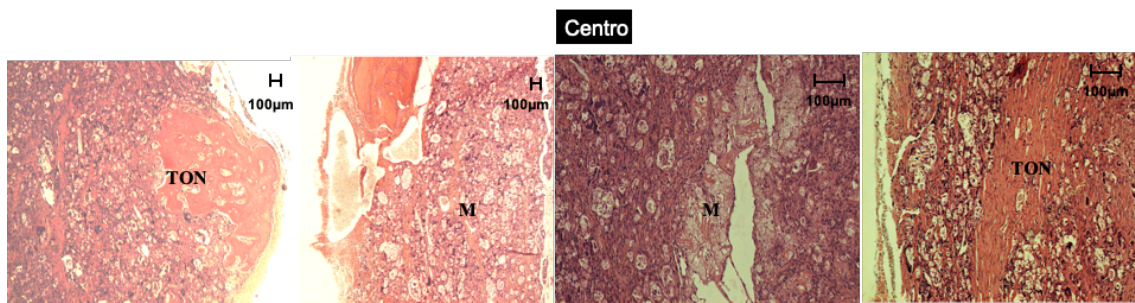


Figura 18. Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CP aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 6,3x nas duas primeiras e 12,5x nas duas últimas. Observamos tecido ósseo neoformado (TON) associado a áreas de tecido osteóide e fragmentos de membrana (M) em processo de degradação.

60 dias: alguns poucos animais tiveram o fechamento total do defeito e a maior parte não, mas se aproximaram muito da neoformação óssea total. Nota-se ainda a presença de fragmentos de membrana e áreas de tecido conjuntivo maduro com disposição paralela das fibras e com poucas células (Figura 19).

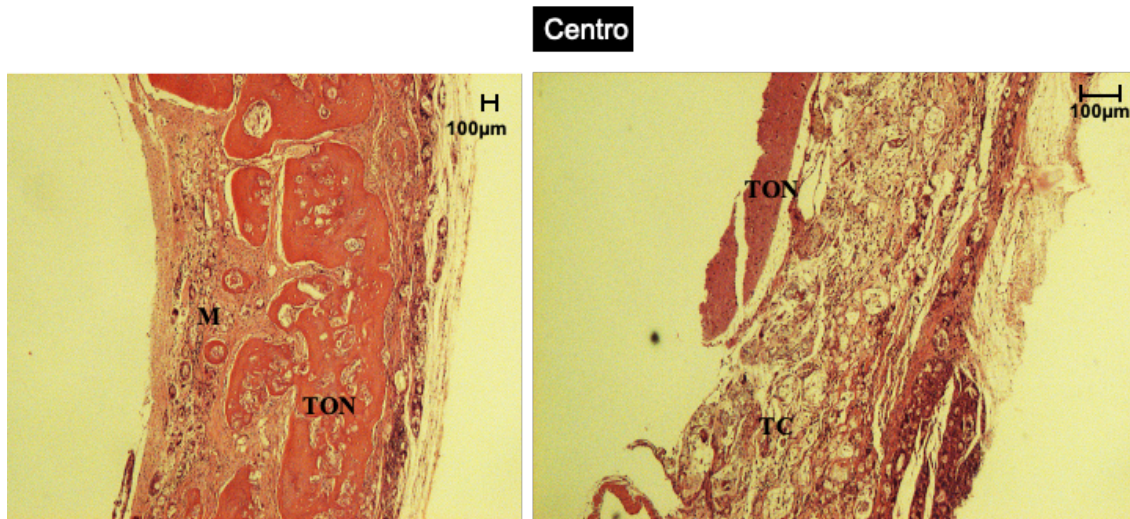


Figura 19. Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CP aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 6,3x. Observamos tecido ósseo neoformado (TON) associado a áreas de tecido osteóide e ainda resquícios de fragmentos de membrana (M) com algumas áreas entremeadas de tecido conjuntivo maduro.

Grupo colágeno bovino + hidroxiapatita (CB)

7 dias: observou-se a presença de alguns grânulos de hidroxiapatita (Figura 20) por vezes no meio da membrana e outras vezes no meio do tecido de granulação. Um tecido infiltrado inflamatório mais intenso em algumas lâminas e um tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado com muitas células gigantes (Figura 20). Notou-se discreta orientação das fibras colágenas numa possível tentativa de organização destas. Início de neoformação óssea junto aos cotos.

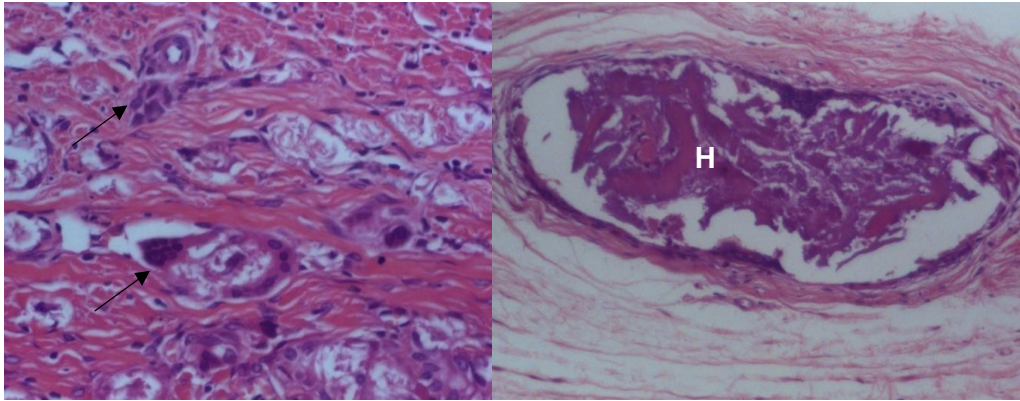


Figura 20. Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CB aos 07 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x. Observamos grânulos de hidroxiapatita no centro do defeito (H) e presença de células gigantes (seta) na imagem ao lado.

15 dias: ainda é possível observar a integridade da membrana. O tecido conjuntivo denso organizado evidencia um maior direcionamento das fibras colágenas. Nota-se uma diminuição da reação inflamatória com presença de células gigantes, fagocitando os grânulos de hidroxiapatita e a presença de ilhas de neoformação óssea na região central e também a partir dos cotos do defeito. É possível observar em algumas lâminas a presença de grânulos de hidroxiapatita que compõe o biomaterial no interior do conjuntivo. Infiltração dos grânulos demonstrando sua porosidade (Figura 21).

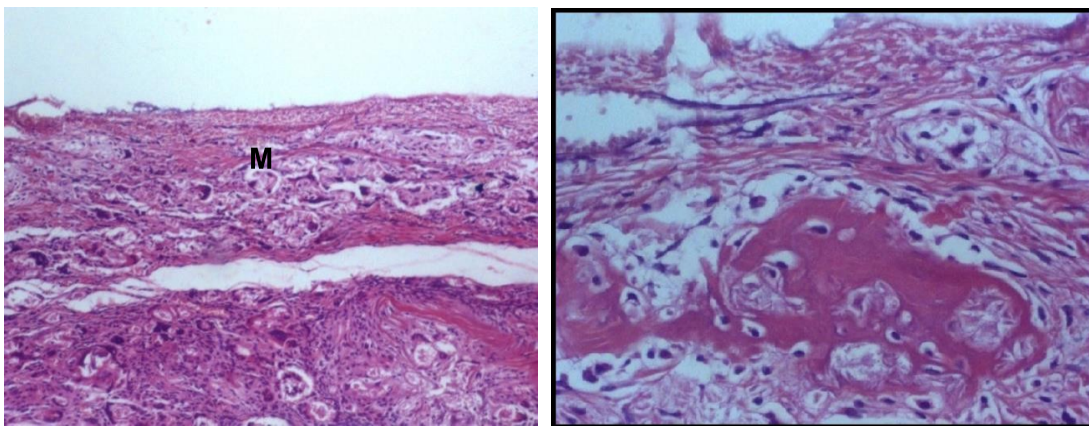


Figura 21. Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo CB aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x na primeira imagem evidenciando a integridade da membrana (M). Na segunda imagem com magnificação de 40x, notamos ilhas ósseas.

30 dias: é possível constatar o processo de degradação da membrana em alguns espécimes, em outros, porém, nota-se a presença da membrana quase íntegra. Há presença de tecido conjuntivo fibroso organizado, intercalado com maior neoformação óssea e pequenas partículas de grânulos de hidroxiapatita envolvidos por neoformação óssea. O centro do defeito ainda não fechado (Figura 22).

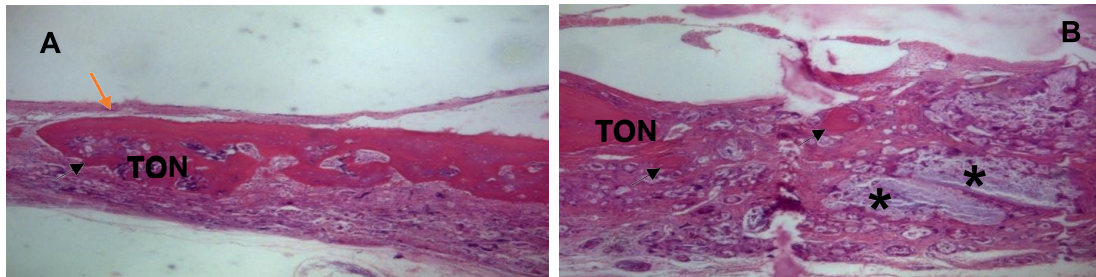


Figura 22. Fotomicrografias do defeito do grupo CB aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 6,5x nas duas imagens, mostrando maior neoformação óssea (TON) e presença ainda de partículas de hidroxiapatita.

60 dias: alguns espécimes tiveram o defeito preenchido por neoformação óssea, outros quase fechados, notando-se a presença de periósteo. É possível observar ainda a presença de fragmentos da membrana e dos grânulos de hidroxiapatita (Figura 23).

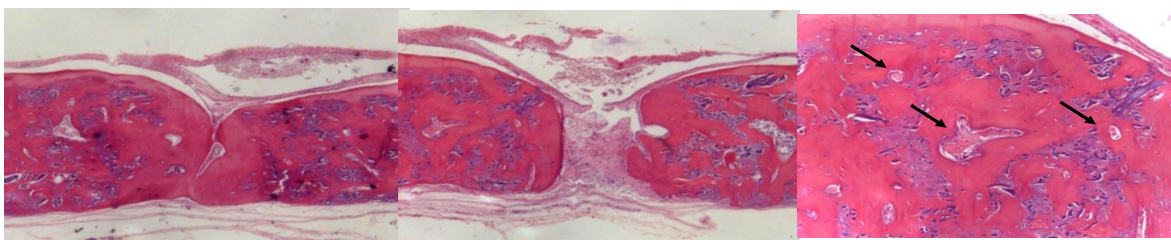


Figura 23. Fotomicrografias do defeito do grupo CB aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x nas duas primeiras imagens, demonstrando fechamento do defeito e outro espécime com presença de tecido conjuntivo (sem fechamento total). Na última imagem, com aumento de 25x, presença de grânulos de hidroxiapatita no final do processo de reparo ósseo.

Grupo colágeno porcino (BG)

7 dias: pode-se observar na reconstrução panorâmica em um aumento de 6.3x, a presença da membrana de colágeno porcino em toda a extensão do defeito ósseo e um tecido

de granulação bem organizado. No aumento de 12,5x, e 40x no centro do defeito, verifica-se que esse tecido de granulação é altamente vascularizado, sem infiltrado inflamatório e nitidamente a presença da membrana englobando todo o defeito. Próximo aos cotos, nos mesmos aumentos, é possível observar a presença da membrana envolvendo o coto e o tecido conjuntivo justaposto ao coto (Figura 24).

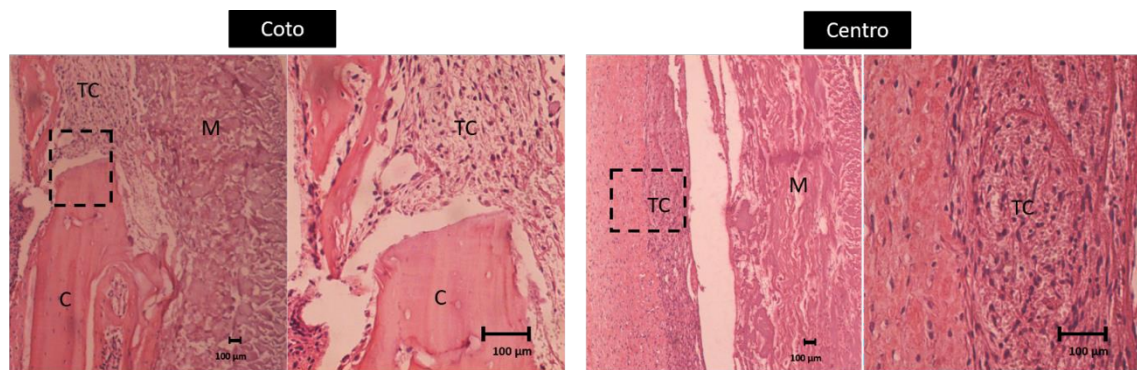


Figura 24. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BG aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Na região do coto (C) nota-se a presença de um tecido conjuntivo (TC) e a membrana (M) íntegra, envolvendo as duas partes. No centro do defeito, nota-se a nitidamente a presença da membrana (M) e um tecido conjuntivo (TC) bem celularizado.

15 dias: Na imagem panorâmica na magnitude de 6,3x, observa-se a presença da membrana íntegra que recobre toda área do defeito ósseo. Nas análises com maior magnitude 12,5x e 40x, pode-se observar um tecido conjuntivo frouxo com pouco infiltrado inflamatório, ainda bem vascularizado e áreas de tecido ósseo neoformado a partir do coto, compresença de tecido conjuntivo no centro do defeito (Figura 25).

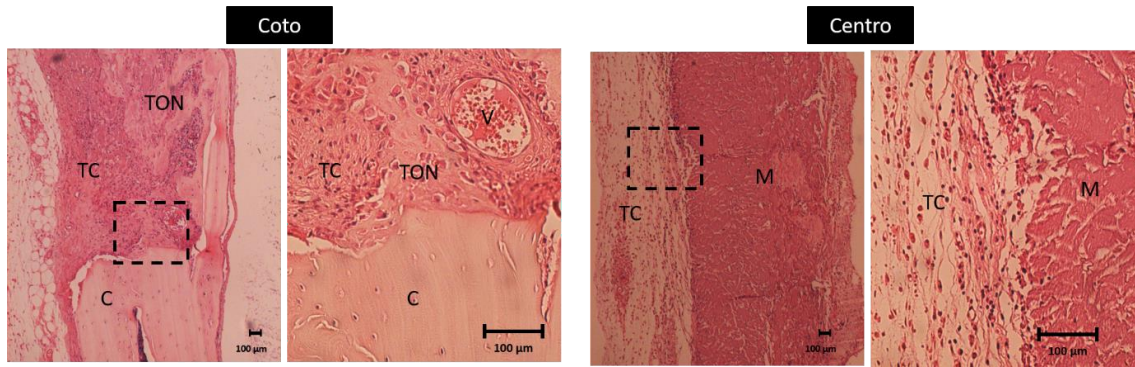


Figura 25. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BG aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Próximo aos cotos (CO), nota-se a área de tecido ósseo neoformado (TON) envolto por tecido conjuntivo (TC) altamente vascularizado (V). No centro do defeito a membrana (M) aparece de maneira íntegra envolvendo todo o defeito.

30 dias: a reconstrução panorâmica (6,3x), demonstra que há praticamente neoformação óssea em todo o defeito ósseo de grande parte dos espécimes, alguns ainda com a presença de pequenas áreas de tecido conjuntivo denso. Nas imagens de maior aumento (12,5x e 40x) verifica-se que o centro do defeito apresenta sítios com tecido ósseo maduro e quase o fechamento total do defeito e outros espécimes nota-se a presença de tecido conjuntivo fibroso organizado. A neoformação óssea a partir dos cotos foi observada em todos os espécimes, confirmando que o reparo acontece no sentido central. Observou-se abundante quantidade de tecido ósseo neoformado entremeado por fragmentos da membrana (Figura 26).

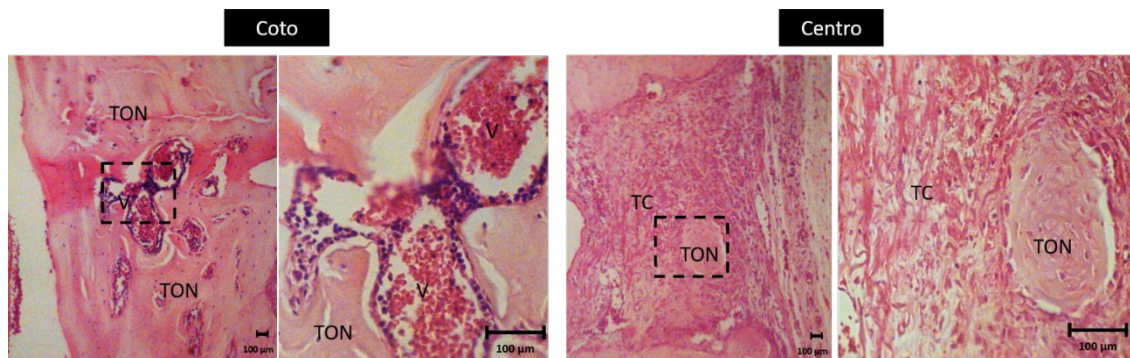


Figura 26. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BG aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Na região do coto ósseo, nota-se a presença de área de tecido ósseo neoformado (TON) envolto por grandes vasos sanguíneos (V). No centro do defeito, área de tecido ósseo neoformado (TON) aparece envolto por tecido conjuntivo (TC).

60 dias: A imagem panorâmica (6,3x) mostra um defeito ósseo completamente regenerado por tecido ósseo e em imagens mais detalhadas observa-se que a neoformação óssea nos cotos e no centro do defeito foram semelhantes aos espécimes do grupo de 30 dias, mas com tecido ósseo neoformado preenchendo praticamente toda a cavidade. Com maior aumento (12,5x e 40x) no centro do defeito e nos cotos, observa-se a presença de tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo. Em algumas imagens foi observado presença de membrana remanescente (Figura 27).

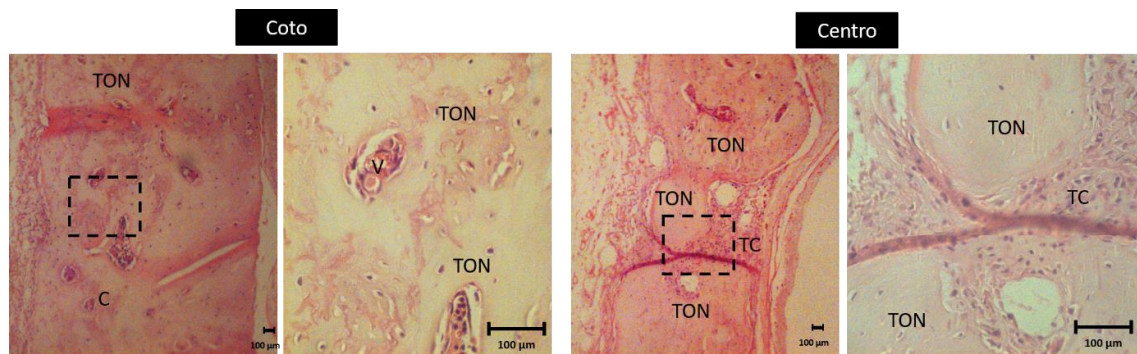


Figura 27. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BG aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. O coto ósseo (C) já se confunde com a área total de tecido ósseo neoformado (TON), sendo possível observar grandes vasos sanguíneos (V) e o tecido ósseo ativo pela presença de osteócitos viáveis. No centro do defeito, grande área de tecido ósseo neoformado (TON) é visualizada, garantindo quase o fechamento total do defeito.

Grupo coágulo (GC)

7 dias: na vista panorâmica, observa-se o defeito ósseo preenchido por um tecido de granulação e quando se avaliou os detalhes em maior aumento pode observar hipervascularização no tecido ósseo neoformado (TON), e presença de atividade fibroblástica. Foi possível observar também na borda do defeito ósseo, em direção ao centro da ferida, neoformação óssea, com tecido ósseo primário e aleatoriamente distribuído, ricamente celularizado por osteócitos e recoberto em suas superfícies por osteoblastos. A neoformação óssea foi notada nos cotos da ferida cirúrgica, sendo ausente na região central, com abundante tecido de granulação jovem, contendo macrófagos, neoformação vascular, fibroblastos e pouca matriz extracelular preenchendo a região central da ferida (Figura 28).

Centro

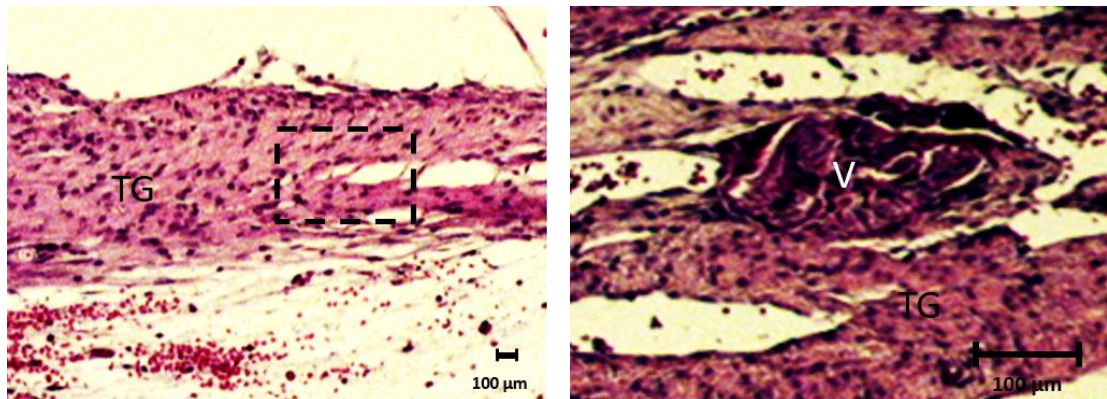


Figura 28. Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo GC aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Um grande tecido de granulação (TG), e a presença de vasos sanguíneos (V), são observados.

15 dias: na imagem panorâmica verifica um tecido conjuntivo frouxo preenchendo o defeito ósseo e em maior aumento observou-se a partir da borda do defeito ósseo indo em direção ao centro da ferida, uma neoformação óssea, com tecido ósseo primário e aleatoriamente distribuído, abundante em osteócitos e recoberto em suas superfícies por osteoblastos. Foi observado neoformação óssea unicamente nos cotos do defeito cirúrgico, no centro do defeito crítico ausência de neoformação óssea, com presença de abundante tecido de granulação jovem, contendo macrófagos, neoformação vascular, fibroblastos e escassa matriz extracelular preenchendo a região central da ferida (Figura 29).

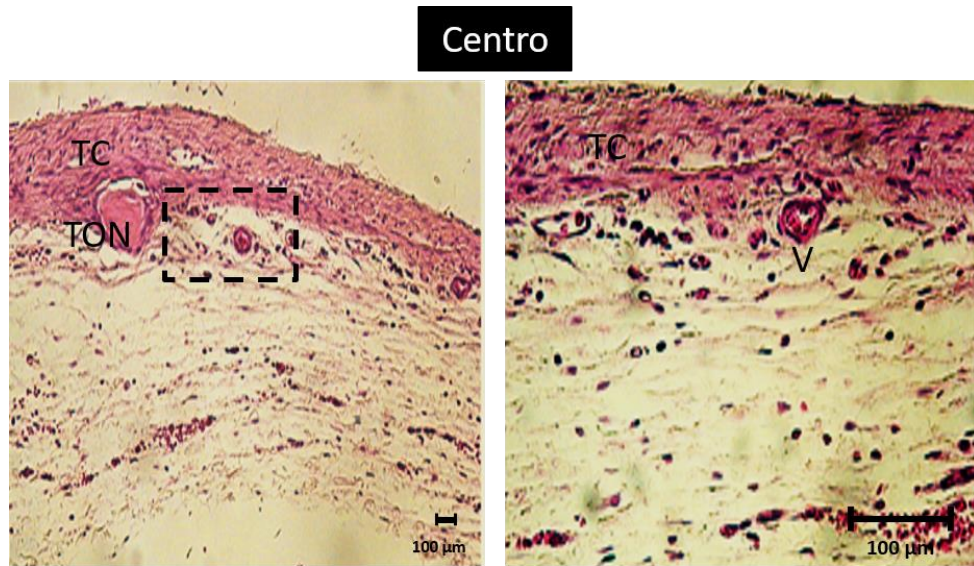


Figura 29. Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo GC aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Nota-se um tecido conjuntivo (TC) levemente vascularizado, vasos sanguíneos (V) distribuídos pelo defeito e pequenas áreas de tecido ósseo neoformado (TON).

30 dias: a imagem panorâmica permite verificar que o defeito está ligeiramente menor com tecido ósseo neoformado nas bordas da ferida e o centro preenchido por tecido conjuntivo. Em aumentos maiores nota-se a presença de maior área óssea neoformada próximo aos cotos do defeito, e o restante da área preenchida por tecido conjuntivo frouxo não modelado. Foi observado área de osteotomia com os cotos ósseos esquerdos e direito com discreta neoformação óssea em suas margens, com o centro do defeito crítico preenchido por tecido conjuntivo fibroso (Figura 30).

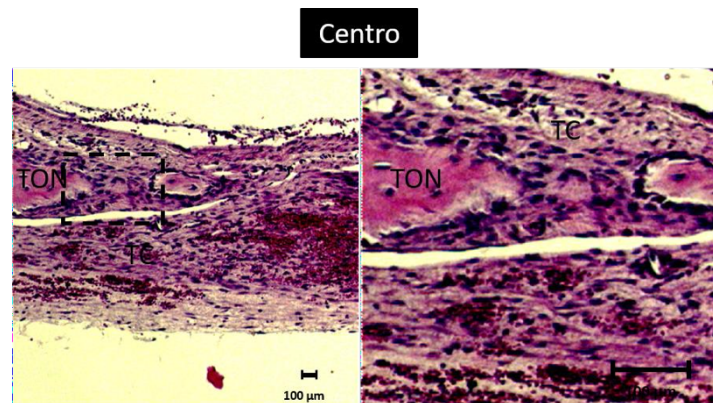


Figura 30. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Tecido conjuntivo (TC) mais organizado com pequenas áreas de tecido ósseo neoformado (TON) envolvidas por grandes aglomerados celulares (células osteoprogenitoras).

60 dias: a imagem panorâmica dos espécimes permite verificar que o defeito se encontra ligeiramente menor com áreas de neoformação óssea próximo aos cotos e no centro a presença de tecido conjuntivo denso. Essas observações foram também encontradas nas análises com maior aumento sendo que nas proximidades dos cotos, apresentassem sem sinais de neoformação óssea, com preenchimento de tecido conjuntivo imaturo, com presença de infiltrado inflamatório e neutrófilos polimorfonucleares (Figura 31).

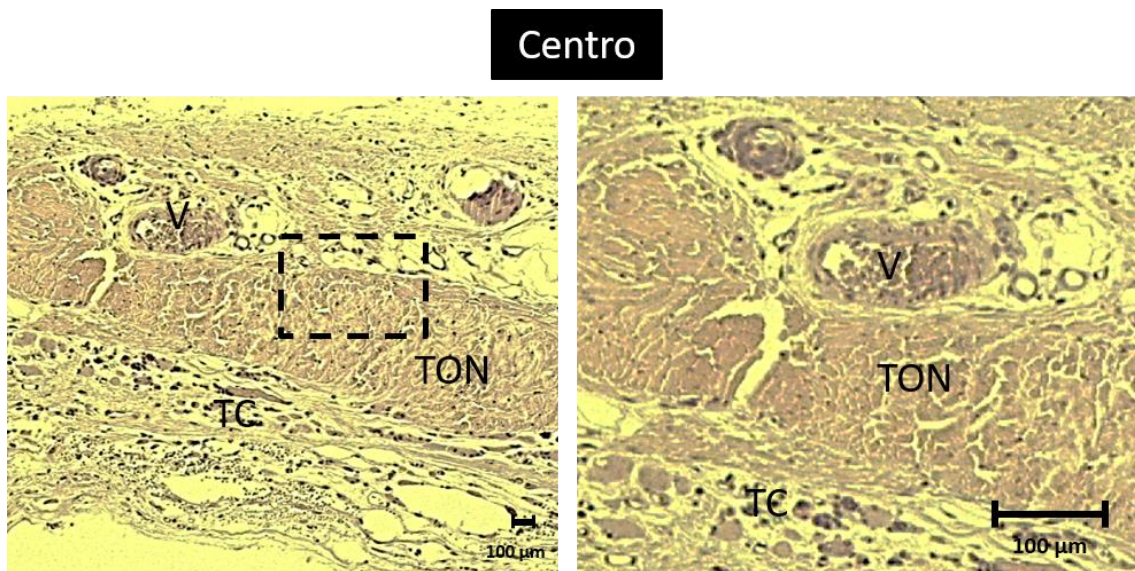


Figura 31. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo GC aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x. Tecido conjuntivo organizado (TC), áreas de tecido ósseo neoformado (TON), espalhadas pelo defeito e grandes vasos sanguíneos (V), próximos a áreas de neoformação óssea.

4.2 Análise histométrica

Os resultados obtidos foram interpretados de maneira a traçar o perfil inflamatório e avaliar a capacidade osteopromotora de cada membrana testada em comparação com o controle positivo (BG).

4.2.1 Perfil inflamatório (células e vasos sanguíneos)

Avaliando comparativamente a relação dos grupos em relação aos tempos de 7 e 15 dias (intra grupos), houve diferença estatisticamente significativa somente no grupo colágeno de

peixe (CP) com $p = 0,006$ e não houve diferença nos grupos colágeno porcino (BG) ($p = 0,054$) e colágeno bovino (CB) ($p = 0,789$). No tempo de 07 dias, avaliando a relação entre os grupos, quanto ao conteúdo celular, o grupo CB apresentou maior quantidade de células inflamatórias, seguido pelo grupo CP, porém sem diferença estatística ($p = 0,658$) e o grupo CB atingiu a maior quantidade de linfócitos, porém sem diferença para o grupo CB ($p < 0,053$). No momento da mesma avaliação, já no período de 15 dias, notamos o mesmo padrão de resposta inflamatória, com o grupo CB atingindo maior número de células, com diferença estatística para o grupo GB ($p < 0,001$) e para o grupo CP ($p = 0,002$). Não houve diferença entre os grupos CP e o BG em relação ao conteúdo celular no período de 15 dias (Figura 32).

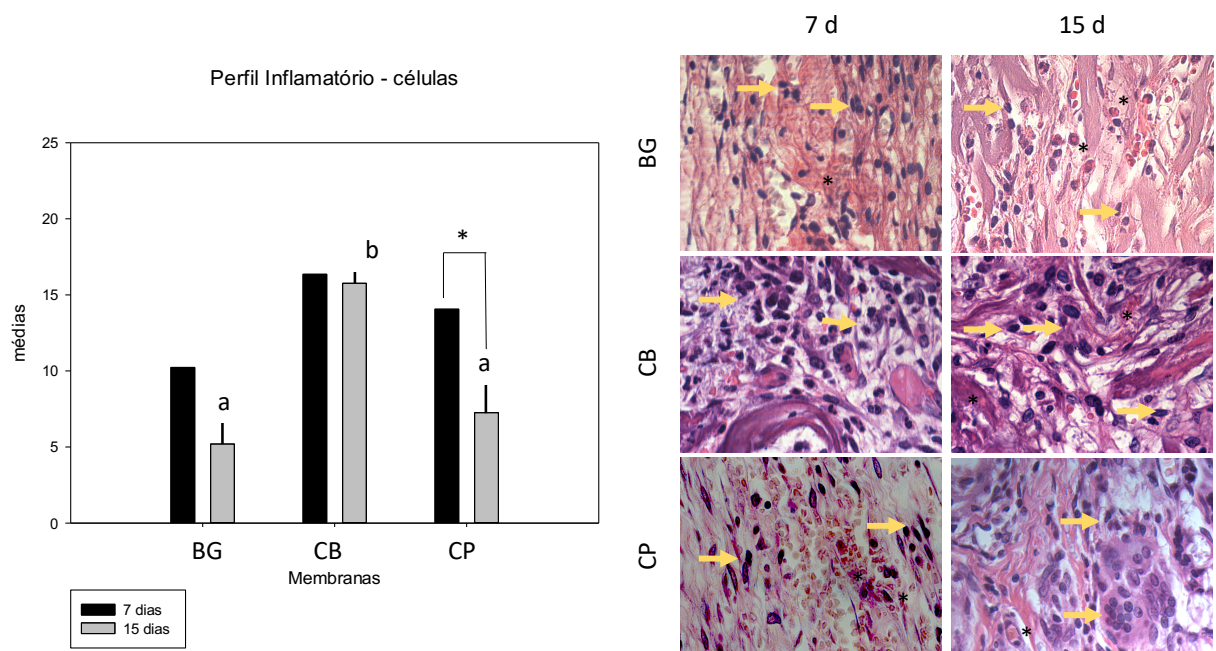


Figura 32. Gráfico demonstrando as comparações das médias e desvio padrão intra e inter grupos para a análise de células inflamatórias (linfócitos) no período de 7 e 15 dias. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas significativas inter grupos para o período de 15 dias, o * demonstra se houve diferença estatística significativa intra grupo no período de 7 para 15 dias. Nas fotomicrografias ao lado realizadas em uma magnificação de 100x, as setas amarelas (↑) indicam as células (linfócitos) e os * os vasos sanguíneos.

Na avaliação da quantidade de vasos sanguíneos, em uma análise comparativa intra grupos, apenas o grupo colágeno de peixe (CP) apresentou uma maior neovascularização dos 7 aos 15 dias ($p = 0,01$) durante o processo de reparo ósseo que foi estatisticamente significativa. Em relação aos grupos, não houve diferença, grupo BG ($p = 0,096$) e grupo CB (0,945). Comparando os resultados entre os grupos, no período de 7 dias, não houve diferença

significante na capacidade osteogênica. Já no período de 15 dias, houve diferença estatística significativa na quantidade de novos vasos sanguíneos para o grupo BG ($p < 0,05$) em relação ao grupo CB. Não houve diferença entre os grupos CB e CP ($p = 0,073$), muito embora o grupo colágeno de peixe tenha tido um desempenho melhor em relação a capacidade de formar vasos sanguíneos (Figura 33).

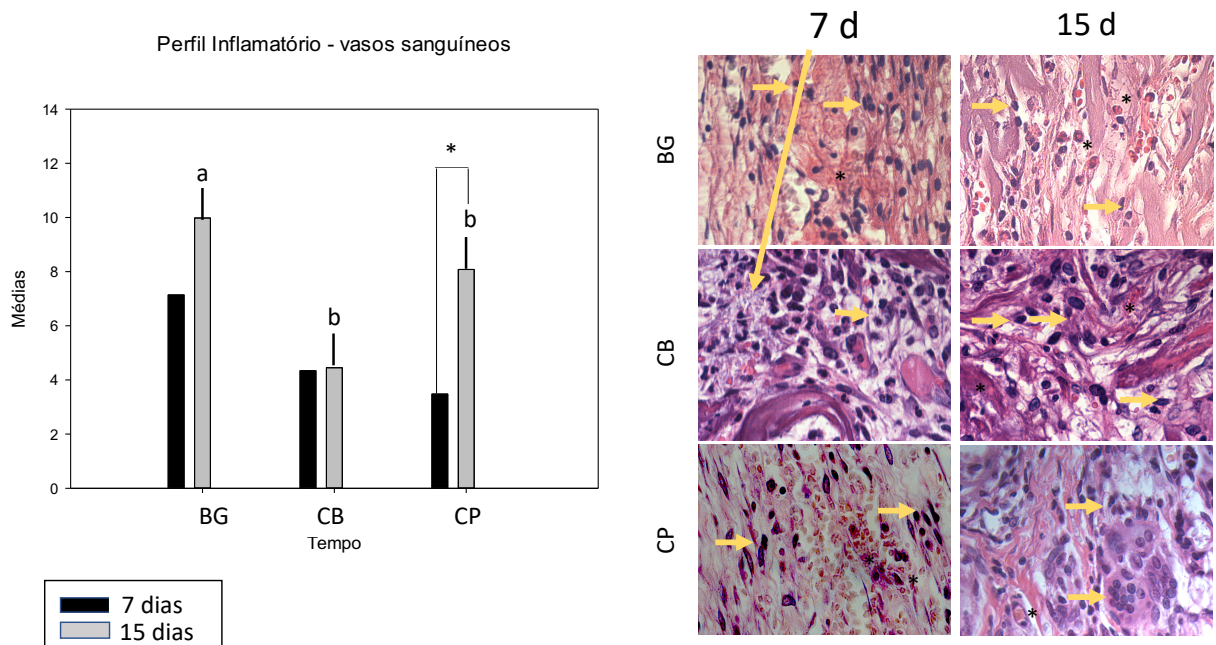


Figura 33. Gráfico demonstrando as comparações das médias e desvio padrão intra e inter grupos para a análise da quantidade de vasos sanguíneos no período de 7 e 15 dias. As letras minúsculas demonstram diferença estatística significativa para o período de 15 dias, não houve diferença estatística para o período de 7 dias. O * demonstra se houve diferença estatística significativa intra grupo no período de 7 para 15 dias. Nas fotomicrografias ao lado realizadas em uma magnificação de 100x, as setas amarelas (↑) indicam as células (linfócitos) e os * os vasos sanguíneos.

4.2.2 Área de osso neoformado (AON)

Em uma análise comparativa do fator membranas, apenas a comparação entre o grupo CB x CP ($p=0,969$) não apresentou diferença estatística, sugerindo um comportamento semelhante entre os grupos. O fator tempo por sua vez, só não teve influência no resultado, demonstrando não haver diferença estatística apenas na comparação entre 7 e 15 dias ($p=0,504$) (Figura 34).

Aos 7 dias de reparo ósseo, todos os grupos se comportaram de maneira similar em relação a neoformação óssea, não apresentando diferença estatística entre nenhum deles. Aos 15 dias, apesar de uma maior quantidade de osso neoformado observada nas amostras dos grupos BG e CB, novamente nenhuma diferença estatística foi apresentada entre os grupos (Figura 34).

Aos 30 dias, em um período mais tardio do processo de reparo ósseo, o grupo coágulo permaneceu apresentando o desempenho esperado, e o grupo CP teve o aumento mais expressivo na quantidade de osso neoformado, não apresentando diferença significativa para o grupo BG ($p = 0,180$) e nem para o grupo CB ($p = 1,000$). No último tempo experimental analisado, aos 60 dias, o grupo BG teve o melhor desempenho no processo de neoformação óssea, seguido pela membrana de colágeno de peixe, e sem diferença estatística significativa ($p = 0,199$) entre esses grupos. O grupo CB teve um desempenho inferior em relação às outras membranas, com diferença significativa para o grupo BG ($0,013$) mas não significativa para o grupo CP ($p = 0,774$) (Figura 34).

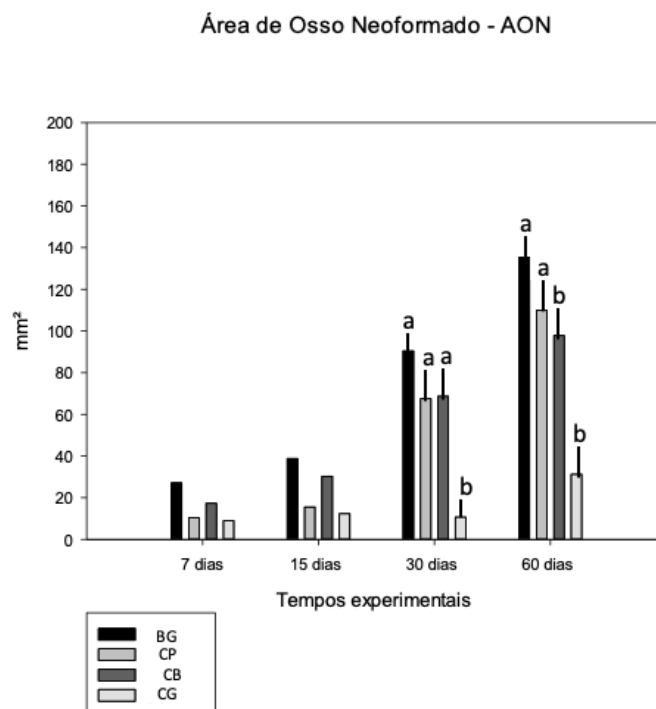


Figura 34. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão da área de osso neoformado de todos os grupos (BG, CP, CB e CG) para os tempos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias. As letras minúsculas demonstram diferença estatística significativa inter grupos para os tempos de 30 e 60 dias, nos períodos de 7 e 15 dias, não houve diferença estatística entre os grupos analisados.

4.3 Análise de micro-tc

O grupo BG apresentou a maior média de BV ($14,247\text{mm}^3$), seguindo pelo grupo CB ($11,850\text{mm}^3$) e por último, o grupo foco do nosso trabalho, CP ($9,560\text{mm}^3$) (Figura 35A, com as seguintes médias de 34,7%, 33% e 22,8% respectivamente para BV/TV. Na análise comparativa entre os grupos, o grupo BG apresentou diferença estatística significativa para os dois parâmetros (BV e BV/TV) em relação ao grupo CP ($p = 0,028$ / $p < 0,05$), mas não ao grupo CB ($p = 0,625$ / $p > 0,05$). Também houve diferença do grupo CB em relação ao grupo CP ($p = 0,035$ / $p < 0,05$) (Figuras 35B e 36).

Em relação ao trabeculado ósseo, para o Tb.th médio, os grupos BG (0,250 mm) e CP (0,310 mm) apresentaram resultados muito próximos, e o grupo CB, um valor médio mais destoante dos demais (0,375 mm), tanto que houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos BG e CB ($p = 0,011$) (Figura 35C). Em se tratando da relação de Tb.Sp e Tb.N, o grupo GB atingiu novamente um melhor resultado, com menor espaçamento no trabeculado ósseo (0,427 mm) e o maior número de trabéculos (1,483 *per* mm), não apresentando diferença estatística em Tb.Sp entre os grupos avaliados (figura 35D). Para o parâmetro TB.N, o grupo GB apresentou resposta superior e com diferença estatística em relação ao grupo CB e CP ($p < 0,05$) (Figura 35E).

A avaliação do Po.tot demonstrou a menor porosidade para o grupo BG (65,130%), seguido do grupo CB (66,82%) e por último o grupo CP (77,157%) com diferença estatística relevante do grupo CP para o grupo BG ($p = 0,029$) e para o grupo CB ($p = 0,037$) e sem diferença entre os grupos BG e CB ($p > 0,05$) (Figura 35F).

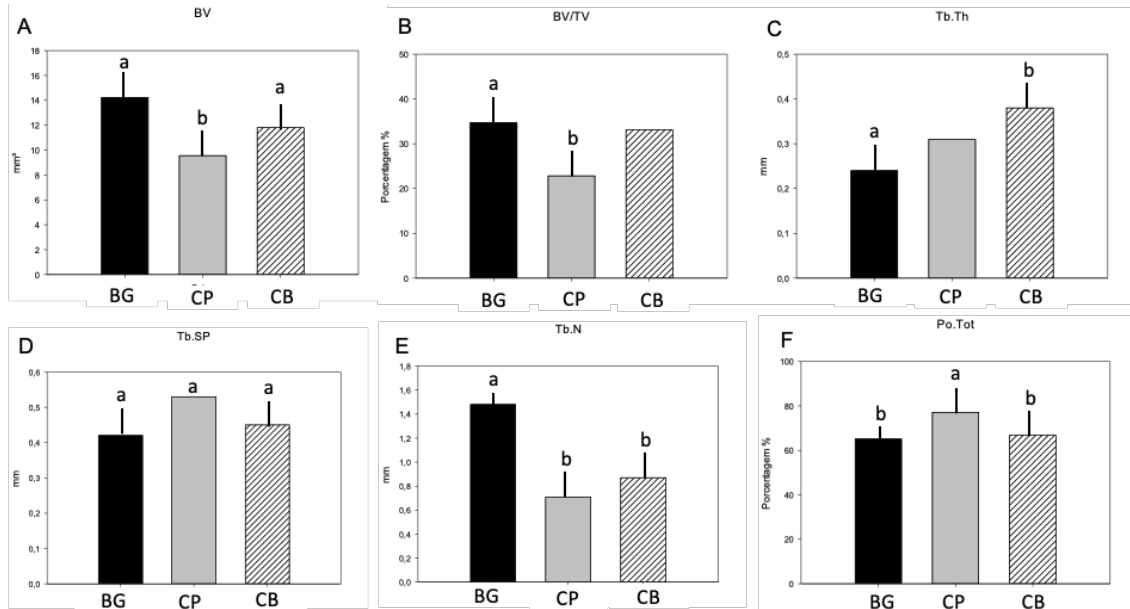


Figura 35. Gráficos demonstrando a média e o desvio padrão do (A)BV, (B)BV/TV, (C)Tb.th, (D)Tb.Sp,(E)Tb.n, (F)Po.tot no período de 60 dias para os grupos BG, CP e CB. As diferenças estatísticas significantes entre os grupos estão representadas pelas letras minúsculas diferentes (a, b, c).

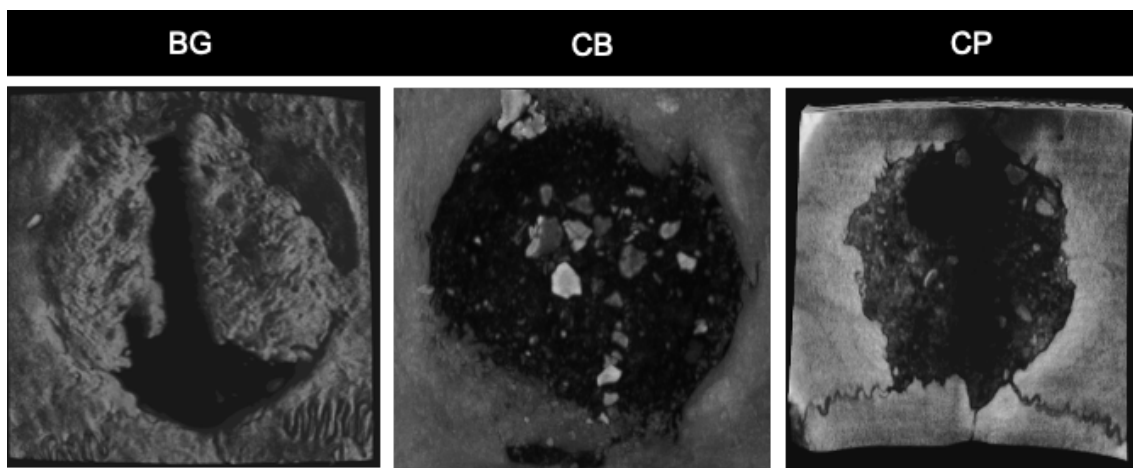


Figura 36. Reconstrução axial do defeito crítico na calota dos animais após 60 dias de reparo ósseo, paraos grupos BG, CB, e CP. Nota-se a maior área de neoformação óssea para o grupo BG, acompanhado do grupo CB (com presença de grânulos de hidroxiapatita) e por último o grupo CP.

4.4 Análise Imunoistoquímica

As avaliações imunoistoquímicas foram realizadas através de análise qualitativa subjetiva com atribuição de escores, em que foi caracterizada a imunomarcagem para osteocalcina e osteopontina que sinalizam o processo de formação e reabsorção óssea.

Para a proteína osteopontina (OP), marcador importante que caracteriza a etapa precoce de mineralização do tecido ósseo, observamos aos 07 e 15 dias pós-operatórios no grupo BG, moderada marcação extracelular; para o grupo CP marcação intensa e moderada; e para o grupo CB, marcação intensa e moderada, respectivamente, indicando possível aumento da atividade osteoblástica. Com 30 dias pós-operatórios, notamos imunomarcação leve para o grupo BG; para os grupos CP e CB marcação moderada. Já no período de 60 dias pós-operatórios, para o grupo BG, marcação moderada; para o grupo CP moderada; e para o grupo CB, marcação leve (Figura 37).

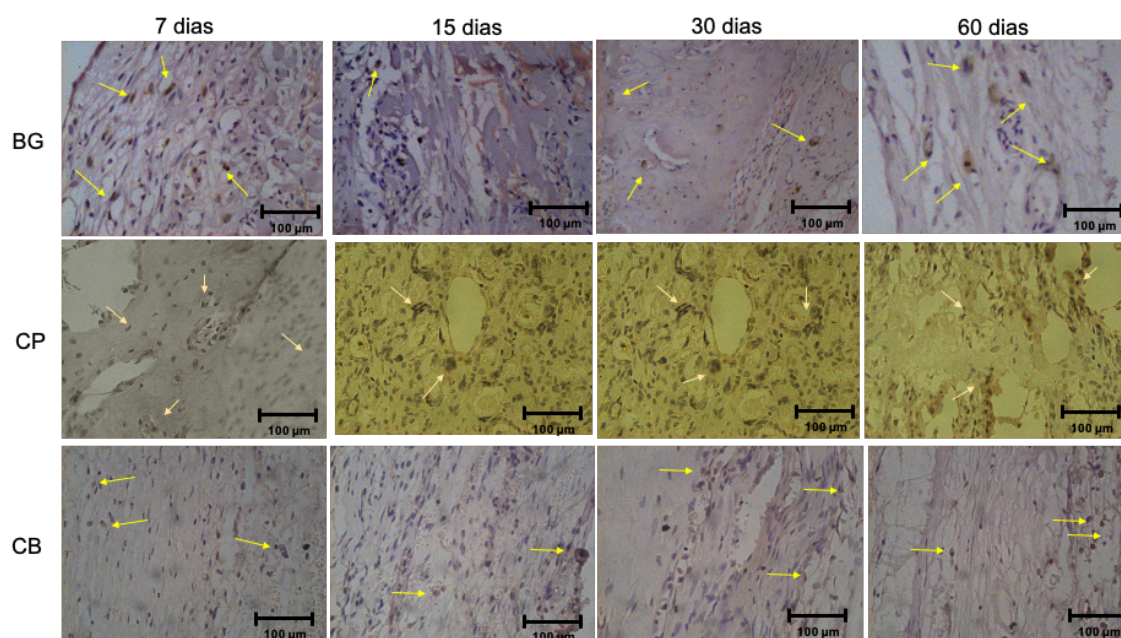


Figura 37. Fotomicrografias dos grupos BG, CP e CB, durante os períodos de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x, evidenciando as imunomarcações de osteopontina (setas amarelas).

Em se tratando da osteocalcina (OC), proteína que caracteriza o fenótipo osteoblástico, que sinaliza a fase tardia da mineralização, notamos aos 07 e 15 dias pós-operatórios, marcação moderada para o grupo BG; já para o grupo CP moderada em ambos os tempos; e para o grupo CB, marcação leve e moderada, respectivamente. No tempo de 30 dias pós-operatórios, para o grupo BG, observamos uma marcação intensa para osteocalcina; para o grupo CP marcação intensa; e para o grupo CB, temos uma presença moderada desta proteína na matriz extracelular. Já no tempo final de 60 dias, para o grupo BG, ainda observamos uma marcação intensa; no grupo CP, moderada; e por último, no grupo CB, marcação moderada (Figura 38).

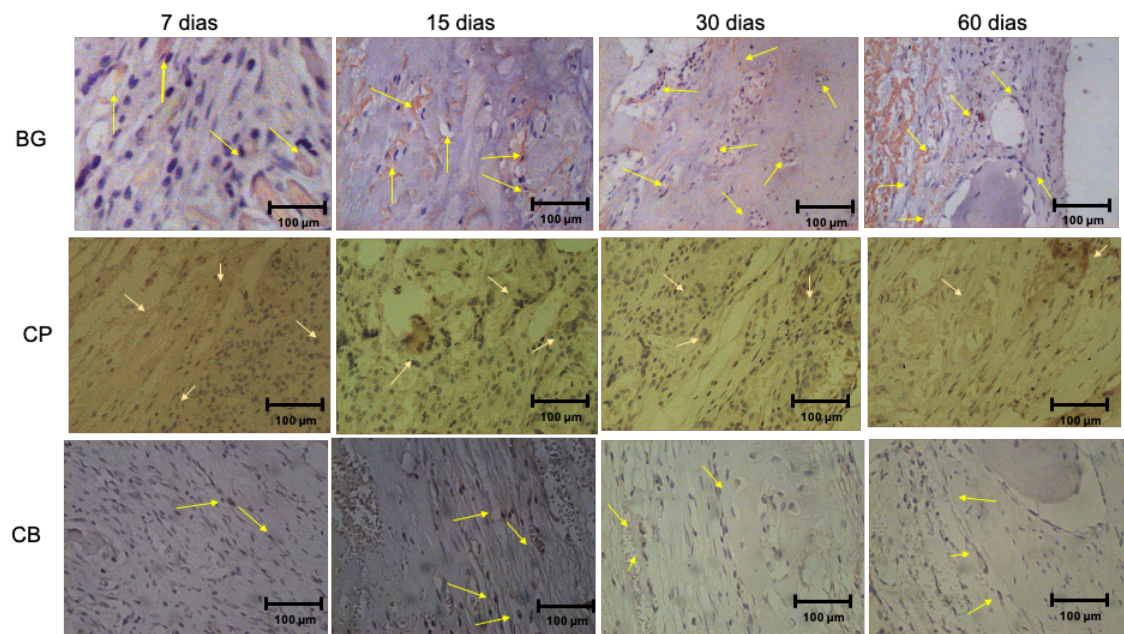


Figura 38. Fotomicrografias dos grupos BG, CP e CB, durante os períodos de reparo ósseo nas magnificações de 12,5x e 40x, evidenciando as imunomarcações de osteocalcina (setas amarelas).

5 DISCUSSÃO

Para regenerar um tecido é necessário que se devolva completamente sua capacidade física e estrutural [23], e nesse contexto, quando pensamos em ROG, devemos devolver um tecido ósseo a semelhança do osso perdido [36] e para que esse processo ocorra o uso de uma membrana não é uma opção, e sim uma necessidade, visto que é por meio delas que teremos uma barreira biológica que permitirá que o processo de ROG efetivamente aconteça [12]. Este aspecto foi observado quando analisamos os resultados do grupo que denominamos de controle negativo, onde a não utilização de uma barreira em um defeito crítico de 8 mm o processo de ROG não ocorre.

A questão é: diante de tantas opções quais são os pontos importantes a observamos para que uma seleção adequada desse material? Basicamente poderíamos dizer que a princípio devemos pensar na capacidade de manutenção da estrutura da membrana de forma integra seja um ponto importante. Contudo, é necessário observar o comportamento biológico da membrana de uma forma mais ampla como: permeabilidade, tanto vascular quanto celular, baixa reação inflamatória, apresentar boa resistência mecânica e manutenção da integridade até que um tecido neoformado seja produzido sem que ocorra a interferência de tecidos não desejados nas áreas de reparo [3,20,27,28].

O uso do colágeno como matéria prima para confecção de membrana, apresenta muitas vantagens como: biocompatibilidade, por ser absorvida permite que seja realizado um procedimento cirúrgico de etapa única; possui boa integração tecidual, com menor risco de exposição da membrana, radiolucidez que permite a imagem do osso regenerado durante a cicatrização [17]. Contudo, quando está na sua forma mais natural, apresenta um processo de reabsorção rápida, o que faz com que tratamentos adicionais, em especial os químicos, sejam realizados, a fim de melhorar este aspecto [34].

A membrana de colágeno porcino (Bio-Gide®) utilizada neste trabalho, é a líder no mercado neste setor. É uma membrana que não apresenta retificação do colágeno, ou seja, não foi realizado nenhum tratamento adicional para que sua atividade como membrana fosse estendida, o que aumenta sua biocompatibilidade visto os resultados obtidos no perfil inflamatório, e faz com que seus resultados sejam tão expressivos nos processos de neoformação óssea como pudemos observar neste trabalho, indo de encontro a outros trabalhos disponíveis na literatura [30,31,32]. A análise dos períodos finais 30 e 60 dias pudemos verificar que os defeitos críticos foram praticamente fechados em quase todos os animais,

demonstrando ter eventos biológicos bem definidos observados na análise imunohistoquímica, com predominância da Osteopontina nos tempos iniciais e da Osteocalcina nos tempos finais. Esses processos mais ordenados permitiram que a Bio-Gide® obtivesse uma neoformação óssea mais rápida e em maior volume quando comparada as membranas avaliadas nesta pesquisa.

A membrana de colágeno bovino está associada a hidroxiapatita, e provavelmente essa associação foi realizada para que a membrana mantivesse sua estrutura íntegra por mais tempo, contudo, o que observamos é que por volta dos 30 dias já temos parte de sua estrutura em degradação. Biologicamente, pode-se notar um bom desempenho, e a presença da hidroxiapatita, fez com que alguns grânulos fossem encontrados dentro dos defeitos o que permitiu verificar que esse material além de ter a propriedade de osteopromoção, em algumas lâminas, os grânulos de hidroxiapatita tivessem o papel de osteocondução, o que também melhora o desempenho dessa membrana. Esses aspectos podem ser observados principalmente nos resultados imunohistoquímicos em que a osteopontina se manteve elevada desde os tempos iniciais, inclusive mantendo sua resposta nos tempos finais, indicando que a atividade osteoblástica para neoformação óssea é ativa até o último período avaliado. Quanto a análise histométrica os valores obtidos neste trabalho mostraram que membranas de colágeno bovino são adequadas para procedimentos de ROG indo em consonância ao trabalho de Oliveira *et al.* [33].

A membrana de colágeno de peixe, nosso principal foco neste estudo, foi possível observar um comportamento que se apresentou também satisfatória nesse processo de osteopromoção embora seu resultado final na porcentagem de neoformação seja inferior a das duas outras membranas estudadas; ele não apresentou diferenças estatísticas com o grupo colágeno bovino. Um aspecto interessante a ser ressaltado diz respeito as análises imunohistoquímica que permitiram verificar que sua atividade osteoblástica continua inclusive nos tempos finais a semelhança do que foi observado na membrana de colágeno bovino, e este fato reforça a ideia de uma manutenção da formação óssea após o período de 60 dias avaliados.

A avaliação dos resultados obtidos pela micro-ct utilizado permitiu que pudessemos complementar os resultados obtidos na histometria de uma forma mais clara. Mesmo com o desempenho superior da membrana porcina sobre as demais, houve uma boa formação óssea no grupo membrana de colágeno bovino, e uma formação regular na de colágeno de peixe estando de acordo com estudo anterior que inclusive demonstrou que o colágeno de peixe

influenciou a diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais humanas da mesma forma que o colágeno suíno [29]. Por meio das reconstruções de micro-tc, notamos que o novo osso formado quando utilizamos a membrana porcina apresentou-se mais maduro, com mais qualidade do trabeculado em comparação às outras membranas. A membrana bovina teve uma resposta bem próxima a líder do mercado, porém com trabeculado ósseo mais disperso, provavelmente por não ter atingido ainda a maturação óssea ideal, complementando os resultados da imunohistoquímica, tendo em vista a presença ainda de sinalização da osteopontina com 30 e 60 dias, evidenciando ainda o processo de mineralização. Na membrana de peixe, houve formação óssea menor, provavelmente pelo colabamento (devido a sua espessura) e pela reação inflamatória um pouco maior, talvez devido à sua própria constituição e/ou tratamento do colágeno, podendo interferir no reparo local.

Neste aspecto, a reação inflamatória está em geral relacionada ao tipo de tratamento que o colágeno recebe para ter mais duração e melhor resistência mecânica ao colabamento ao longo do processo de ROG, que o habilita como um bom material para essa função. Neste ponto foi claro a biocompatibilidade da membrana de colágeno porcino, que não apresenta reticulação do colágeno e que, portanto, possui alta biocompatibilidade, não só neste estudo como de outros trabalhos [30,31,32].

Mas como exposto anteriormente quando há um processo de reticulação do colágeno, em geral por um processo químico, isto pode resultar em processos inflamatórios mais intensos, interferindo na qualidade da membrana e nas suas características biológicas e capacidade de osteopromoção [34,35]. Nenhuma das membranas testes apresentou infiltrado inflamatório muito intenso e fora da curva normal esperado, além disso, constatamos uma boa aplicabilidade da membrana de peixe, corroborando com outros estudos [3,20,37,28]. Esses resultados positivos podem estar associados com a forma com que as membranas estudadas sofreram seus processos de reticulações que permitiu que todas tivessem boa permeabilidade vascular e celular e manutenção de suas estruturas até que um tecido consistente fosse formado. No caso da membrana de colágeno bovino não deve ter sofrido um tratamento químico sendo sua resistência mecânica melhorada por meio da adição de partículas de hidroxiapatita. Já na membrana de colágeno de peixe tudo indica que foram adicionadas camadas a mais para tornar a membrana mais resistente e estável. Pudemos observar esses fatos nas análises histológicas, em que o infiltrado inflamatório esteve dentro da normalidade, permitindo a permeabilidade vascular e celular, manutenção da estrutura das membranas até 30 dias em quase todas as amostras.

No que diz respeito a resistência mecânica, foi observada histologicamente que a quantidade em espessura de osso neoformado nos defeitos protegidos com a membrana teste de peixe, apresentaram-se mais delgados quando comparados aos resultados obtidos pelas membranas de colágeno porcino e bovino. A espessura da membrana de peixe utilizada na nossa pesquisa foi relativamente menor quando comparada com as outras, portanto parece que ela não foi suficientemente resistente do ponto de vista mecânico para se manter e com isso houve maior propensão ao colapamento em direção ao centro do defeito, diminuindo o espaço a ser regenerado e conseqüentemente tendo uma neoformação óssea mais delgada. Outro ponto a ressaltar é que o fato de ser mais espessa também pode ter interferido de alguma forma na seletividade de passagem de células que promovam neoformação óssea.

O principal desafio das membranas como barreira absorvíveis é a sua manutenção até que a formação óssea esteja completa e então integrá-la com o tecido circundante ou ser absorvida pelo corpo hospedeiro. A integridade da membrana deve durar por 4 a 6 meses para apoiar a formação e maturação de novo tecido. A seleção e combinação de biomaterial apropriado são importantes para alcançar as propriedades ideais da membrana como barreira. Portanto, as propriedades físicas e mecânicas adequadas da membrana reabsorvível devem ser acompanhadas de propriedades de biocompatibilidade [22].

Desta forma ao contrário do que se pensava durante muito tempo, a seleção do tipo de membrana a ser usada em um processo regenerativo tem influência direta nos resultados, não somente por seu papel de barreira promovendo a osteopromoção, mas biologicamente, pois é a partir dela que ocorreram fenômenos de permeabilidade vascular e celular, eventos inflamatórios que repercutirão em um melhor ou pior processo regenerativo. Com isso, observar qual a demanda clínica, tipo de defeito a ser regenerado, técnica cirúrgica escolhida e avaliação das propriedades física, químicas e biológicas dos biomateriais e da membrana farão com que o processo de ROG atinja seus objetivos.

Cabe lembrar que esta pesquisa tem suas limitações uma vez que testes mecânicos não foram realizados a fim de verificar as propriedades elásticas das membranas que é outro ponto importante no momento da seleção da membrana. Estudos futuros deverão realizar essas análises.

6 CONCLUSÃO

A membrana de colágeno teve um bom desempenho no processo de osteopromoção para a neoformação óssea, com resultados muito próximos em relação as outras duas membranas, entretanto apresentou um processo de reação inflamatória maior, o que precisa ser avaliado em estudos futuros, se há interferência na qualidade desse osso neoformado.

Desta forma, entende-se hoje que a busca cada vez mais específica e padronizada de materiais fazem toda a diferença nos resultados das reconstruções ósseas. Não somente o tipo de biomaterial irá influenciar na quantidade e na qualidade de osso neoformado, mas o material osteopromotor tem papel tão importante quanto a escolha do material osteocondutor/osteoadutor a ser escolhido. Neste contexto, com os resultados obtidos por este trabalho, concluímos que as membranas aqui estudadas tiveram um bom comportamento biológico, e todas auxiliaram no processo de regeneração óssea guiada.

REFERÊNCIAS

1. Wessing, B.; Lettner, S.; Zechner W. Guided bone regeneration with collagen membranes and particulate graft materials: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **2018**, *33*, 87–100.
2. Bornstein, M.M.; Bosshardt, D.; Buser, D. Effect of two different bioabsorbable collagen membranes on guided bone regeneration: a comparative histomorphometric study in the dog mandible. *J. Periodontol.* **2007**, *78*, 1943-53.
3. Jin, S.; Sun, F.; Zou, Q.; Huang, J.; Zuo, Y.; Li, Y.; Wang, S.; Cheng, L.; Man, Y.; Yang, F.; Li, J. Fish collagen and hydroxyapatite reinforced poly(lactide- co-glycolide) fibrous membrane for guided bone regeneration. *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 2058-2067.
4. Ikumi, R.; Miyahara, T.; Akino, N.; Tachikawa, N.; Kasugai, S. Guided bone regeneration using a hydrophilic membrane made of unsintered hydroxyapatite and poly(L-lactic acid) in a rat bone-defect model. *Dent. Mater. J.* **2018**, *37*, 912-918.
5. Kitayama, S.; Wong, L.O.; Ma, L.; Hao, J.; Kasugai, S.; Lang, N.P.; Mattheos, N. Regeneration of rabbit calvarial defects using biphasic calcium phosphate and a strontium hydroxyapatite-containing collagen membrane. *Clin. Oral Implants Res.* **2016**, *27*, e206-e214.
6. Zeng, N.; van Leeuwen, A.; Yuan, H.; Bos, R.R.; Grijpma, D.W.; Kuijer, R. Evaluation of novel resorbable membranes for bone augmentation in a rat model. *Clin. Oral Implants Res.* **2016**, *27*, e8-e14.
7. Cortellini, P.; Pini Prato, G.; Tonetti, M.S. Periodontal regeneration of human infrabony defects. I. Clinical measures. *J. Periodontol.* **1993**, *64*, 254-260.
8. Wilson, G.J.; MacGregor, D.C.; Klement, P.; Weber, B.A.; Binnington, A.G.; Pinchuk, L. A compliant Corethane/Dacron composite vascular prosthesis: comparison with 4-mm ePTFE grafts in a canine model. *Asaio J.* **1993**, *39*, M526-M531.
9. Becker, W.; Becker, B.E.; Handelsman, M.; Ochsenein, C.; Albrektsson, T. Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets: a study in dogs. *J. Periodontol.* **1991**, *62*, 703-709.

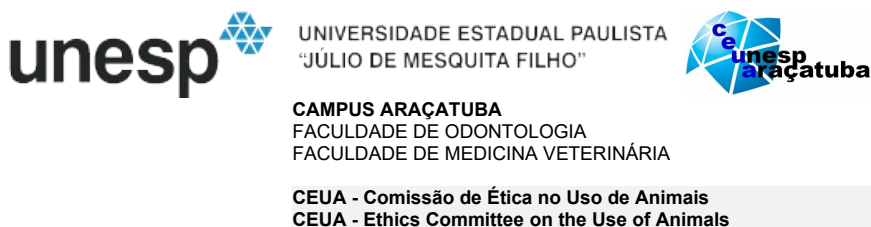
10. Sheikh, Z.; Hamdan, N.; Ikeda, Y.; Gryn timer, M.; Ganss, B.; Glogauer, M. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomater. Res.* **2017**, *21*, 9.
11. Soldatos, N.K.; Stylianou, P.; Koidou, V.P.; Angelov, N.; Yukna, R.; Romanos, G.E. Limitations and options using resorbable versus nonresorbable membranes for successful guided bone regeneration. *Quintessence Int.* **2017**, *48*, 131-147.
12. Sasaki, J.I.; Abe, G.L.; Li, A.; Thongthai, P.; Tsuboi, R.; Kohno, T.; Imazato, S. Barrier membranes for tissue regeneration in dentistry. *Biomater. Investig. Dent.* **2021**, *8*, 54-63.
13. Li, Y.; Qiao, S.C.; Gu, Y.X.; Zhang, X.M.; Shi, J.Y.; Lai, H.C. A novel semiautomatic segmentation protocol to evaluate guided bone regeneration outcomes: a pilot randomized, controlled clinical trial. *Clin. Oral Implants Res.* **2019**, *30*, 344-352.
14. Hadzik, J.; Kubasiewicz-Ross, P.; Kunert-Keil, C.; Jurczyszyn, K.; Nawrot-Hadzik, I.; Dominiak, M.; Gedrange, T. A silver carp skin derived collagen in bone defect treatment-A histological study in a rat model. *Ann. Anat.* **2016**, *208*, 123-128.
15. Simion, M.; Scarano, A.; Gionso, L.; Piattelli, A. Guided bone regeneration using resorbable and nonresorbable membranes: a comparative histologic study in humans. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* **1996**, *11*, 735-742.
16. Chu, C.; Deng, J.; Man, Y.; Qu, Y. Evaluation of nanohydroxyapatite (nano-HA) coated epigallocatechin-3-gallate (EGCG) cross-linked collagen membranes. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2017**, *78*, 258-264.
17. Sbricoli, L.; Guazzo, R.; Annunziata, M.; Gobbato, L.; Bressan, E.; Natri, L. Selection of collagen membranes for bone regeneration: a literature review. *Materials* **2020**, *13*, 786.
18. Jung, R.E.; Glauser, R.; Scharer, P.; Hammerle, C.H.; Sailer, H.F.; Weber, F.E. Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. *Clin. Oral Implants Res.* **2003**, *14*, 556-568.
19. Jung, R.E.; Hälg, G.A.; Thoma, D.S.; Hammerle, C.H. A randomized, controlled clinical trial to evaluate a new membrane for guided bone regeneration around dental implants. *Clin. Oral Implants Res.* **2009**, *20*, 162-168.

20. Santosh Kumar, B.B.; Aruna, D.R.; Gowda, S.V.; Galagali, R.S. Evaluation of a bioresorbable collagen membrane of fish origin in the treatment of periodontal intrabony defects: a prospective clinical study. *Dent. Res. J.* **2013**, *10*, 225-231.
21. Lau, C. S.; Hassanbhai, A.; Wen, F.; Wang, D.; Chanchareonsook, N.; Goh, B.T.; Yu, N.; Teoh, S.H. Evaluation of decellularized tilapia skin as a tissue engineering scaffold. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2019**, *13*, 1779-1791.
22. Pripatnanont, P.; Chankum, C.; Meesane, J.; Thonglam, J. Physical and biological performances of a semi-resorbable barrier membrane based on silk fibroin-glycerol-fish collagen material for guided bone regeneration. *J. Biomater. Appl.* **2021**, *36*, 930-942.
23. Yamada, S.; Yamamoto, K.; Ikeda, T.; Yanagiguchi, K.; Hayashi, Y. Potency of fish collagen as a scaffold for regenerative medicine. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 302932.
24. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the care and use of laboratory animals*, 8th ed.; National Academies Press: Washington, DC, USA, 2011.
25. Percie du Sert, N.; Ahluwalia, A.; Alam, S.; Avey, M.T.; Baker, M.; Browne, W.J.; Clark, A.; Cuthill, I.C.; Dirnagl, U.; Emerson, M.; et al. Reporting animal research: explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol.* **2020**, *18*, e3000411.
26. Becker, W.; Dahlin, C.; Becker, B.E.; Lekholm, U.; van Steenberghe, D.; Higuchi, K.; Kultje, C. The use of e-PTFE barrier membranes for bone promotion around titanium implants placed into extraction sockets: a prospective multicenter study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* **1994**, *9*, 31-40.
27. Yamamoto, K.; Yoshizawa, Y.; Yanagiguchi, K.; Ikeda, T.; Yamada S.; Hayashi Y. The characterization of fish (tilapia) collagen sponge as a biomaterial. *Int. J Polym. Sci.* **2015**, *2015*, 957385.
28. Song, W.K.; Liu, D.; Sun, L.L.; Li, B.F.; Hou, H. Physicochemical and biocompatibility properties of type i collagen from the skin of nile tilapia (*oreochromis niloticus*) for biomedical applications. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 137.

29. Hsu, H.H.; Uemura, T.; Yamaguchi, I.; Ikoma, T.; Tanaka, J. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on fish scale collagen. *J. Biosci. Bioeng.* **2016**, *122*, 219-225.
30. Danieleto-Zanna, C.F.; Bizelli, V.F.; Ramires, G.A.D.; Francati, T.M.; Carvalho, O.S.; Bassi, A.P.F. Osteopromotion capacity of bovine cortical membranes in critical defects of rat calvaria: Histological and immunohistochemical analysis. *Int. J. Biomater.* **2020**, *2020*, 6426702.
31. Bassi, A.P.F.; Bizelli, V.F.; Brasil, L.F.M.; Pereira, J.C.; Al-Sharani, H.; Momesso, G.A.C.; Faverani, L.P.; Lucas, F.A. Is the bacterial cellulose membrane feasible for osteopromotive property? *Membranes* **2020**, *10*, 230.
32. Bassi, A.P.F.; Bizelli, V.F.; Consolaro, R.B.; De Carvalho, P.S.P. Biocompatibility and osteopromotor factor of bovine integral bone-a microscopic and histometric analysis. *Front. Oral Maxillofac. Med.* **2021**, *3*, 1-11.
33. Ramires, G.A.D.; Taino, J.H.; Oliveira, J.C.S.; Faverani, L.P.; Bassi, A.P.F. Evaluation of guided bone regeneration in critical defects using bovine and porcine collagen membranes: histomorphometric and immunohistochemical analyses. *Int. J. Biomater.* **2021**, *2021*, 1-9.
34. Wang, J.; Qu, Y.; Chen, C.; Sun, J.; Pan, H.; Shao, C.; Tang, R.; Gu, X. Fabrication of collagen membranes with different intrafibrillar mineralization degree as a potential use for GBR. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* **2019**, *104*, 109959.
35. Rothamel, D.; Schwarz, F.; Sculean, A.; Herten, M.; Scherbaum, W.; Becker, J. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin. Oral Implants Res.* **2004**, *15*, 443-449.
36. Glossary of Periodontal Terms 4th Ed, Chicago: American Academy of Periodontology. AAP. **2001**.

ANEXOS

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA)



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação de uma nova membrana nacional de colágeno de peixe na regeneração óssea guiada. Avaliação histomorfométrica, imunohistoquímica e de perfil inflamatório**", Processo FOA nº 0100-2021, sob responsabilidade de Ana Paula Farnezi Bassi apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 26 de Novembro de 2021.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 26 de Novembro de 2022.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 26 de Dezembro de 2022.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of a new national fish collagen membrane in guided bone regeneration. Histomorphometric, immunohistochemical and inflammatory profile evaluation**", Protocol FOA nº 0100-2021, under the supervision of Ana Paula Farnezi Bassi presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on November 26, 2021.

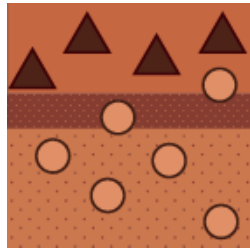
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: November 26, 2022.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: December 26, 2022.


Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br

ANEXO B – Normas da revista selecionada para a publicação do artigo



membranes

Instructions for Authors

Shortcuts

- [Manuscript Submission Overview](#)
- [Manuscript Preparation](#)
- [Preparing Figures, Schemes and Tables](#)
- [Original Images for Blots and Gels Requirements](#)
- [Supplementary Materials, Data Deposit and Software Source Code](#)
- [Research and Publication Ethics](#)
- [Reviewer Suggestions](#)
- [English Corrections](#)
- [Preprints and Conference Papers](#)
- [Authorship](#)
- [Editorial Independence](#)
- [Conflict of Interests](#)
- [Editorial Procedures and Peer-Review](#)
- [Promoting Equity, Diversity and Inclusiveness Within MDPI Journals](#)
- [Resource Identification Initiative](#)

Submission Checklist

Please:

1. read the [Aims & Scope](#) to gain an overview and assess if your manuscript is suitable for this journal;
2. use the [Microsoft Word template](#) or [LaTeX template](#) to prepare your manuscript;
3. make sure that issues about [publication ethics](#), [research ethics](#), [copyright](#), [authorship](#), [figure formats](#), [data](#) and [references format](#) have been appropriately considered;
4. Ensure that all authors have approved the content of the submitted manuscript.
5. Authors are encouraged to add a [biography](#) (optional) to the submission and publish it.

Manuscript Submission Overview

Types of Publications

Membranes has no restrictions on the length of manuscripts, provided that the text is concise and comprehensive. Full experimental details must be provided so that the results can be reproduced. *Membranes* requires that authors publish all experimental controls and make full datasets available where possible (see the guidelines on [Supplementary Materials](#) and references to unpublished data).

Manuscripts submitted to *Membranes* should neither be published previously nor be under consideration for publication in another journal. The main article types are as follows:

- *Article*: Research manuscripts that report new evidence or new conclusions. The journal considers all original research manuscripts provided that the work reports scientifically sound experiments and provides a substantial amount of new information. Authors should not unnecessarily divide their work into several related manuscripts.
- *Communication*: Report on original but preliminary in nature research of high significance.
- *Reviews*: These provide concise and precise updates on the latest progress made in a given area of research. Systematic reviews should follow the PRISMA [guidelines](#).

Submission Process

Manuscripts for *Membranes* should be submitted online at susy.mdpi.com. The submitting author, who is generally the corresponding author, is responsible for the manuscript during the submission and peer-review process. The submitting author must ensure that all eligible co-authors have been included in the author list (read the [criteria to qualify for authorship](#)) and that they have all read and approved the submitted version of the manuscript. To submit your manuscript, register and log in to the [submission website](#). Once you have registered, [click here to go to the submission form for Membranes](#). All co-authors can see the manuscript details in the submission system, if they register and log in using the e-mail address provided during manuscript submission.

Accepted File Formats

Authors must use the **Microsoft Word template** or **LaTeX template** to prepare their manuscript. Using the template file will substantially shorten the time to complete copy-editing and publication of accepted manuscripts. The total amount of data for all files must not exceed 120 MB. If this is a problem, please contact the Editorial Office membranes@mdpi.com. Accepted file formats are:

- **Microsoft Word:** Manuscripts prepared in Microsoft Word must be converted into a single file before submission. When preparing manuscripts in Microsoft Word, the **Membranes Microsoft Word template file** must be used. Please insert your graphics (schemes, figures, *etc.*) in the main text after the paragraph of its first citation.
- **LaTeX:** Manuscripts prepared in LaTeX must be collated into one ZIP folder (including all source files and images, so that the Editorial Office can recompile the submitted PDF). When preparing manuscripts in LaTeX, please use the **Membranes LaTeX template files**. You can now also use the online application **writeLaTeX** to submit articles directly to *Membranes*. The MDPI LaTeX template file should be selected from the **writeLaTeX template gallery**.
- **Supplementary files:** May be any format, but it is recommended that you use common, non-proprietary formats where possible (see **below** for further details).

Disclaimer: Usage of these templates is exclusively intended for submission to the journal for peer-review, and strictly limited to this purpose and it cannot be used for posting online on preprint servers or other websites.

Free Format Submission

Membranes now accepts free format submission:

- We do not have strict formatting requirements, but all manuscripts must contain the required sections: Author Information, Abstract, Keywords, Introduction, Materials & Methods, Results, Conclusions, Figures and Tables with Captions, Funding Information, Author Contributions, Conflict of Interest and other Ethics Statements. Check the Journal **Instructions for Authors** for more details.
- Your references may be in any style, provided that you use the consistent formatting throughout. It is essential to include author(s) name(s), journal or book title, article or chapter title (where required), year of publication, volume and issue (where appropriate) and pagination. DOI numbers (Digital Object Identifier) are not mandatory but highly encouraged. The bibliography software package *EndNote*, **Zotero**, *Mendeley*, *Reference Manager* are recommended.
- When your manuscript reaches the revision stage, you will be requested to format the manuscript according to the journal guidelines.

Cover Letter

A cover letter must be included with each manuscript submission. It should be concise and explain why the content of the paper is significant, placing the findings in the context of existing work. It should explain why the manuscript fits the scope of the journal.

Any prior submissions of the manuscript to MDPI journals must be acknowledged. If this is the case, it is strongly recommended that the previous manuscript ID is provided in the submission system, which will ease your current submission process. The names of proposed and excluded reviewers should be provided in the submission system, not in the cover letter.

All cover letters are required to include the statements:

- We confirm that neither the manuscript nor any parts of its content are currently under consideration or published in another journal.
- All authors have approved the manuscript and agree with its submission to (journal name).

Author Biography

Authors are encouraged to add a biography (maximum 150 words) to the submission and publish it. This should be a single paragraph and should contain the following points:

1. Authors' full names followed by current positions;
2. Education background including institution information and year of graduation (type and level of degree received);
3. Work experience;
4. Current and previous research interests;
5. Memberships of professional societies and awards received.

Note for Authors Funded by the National Institutes of Health (NIH)

This journal automatically deposits papers to PubMed Central after publication of an issue. Authors do not need to separately submit their papers through the NIH Manuscript Submission System (NIHMS, <http://nihms.nih.gov/>).

[\[Return to top\]](#)

Manuscript Preparation

General Considerations

- **Research manuscripts** should comprise:
 - **Front matter:** Title, Author list, Affiliations, Abstract, Keywords
 - **Research manuscript sections:** Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions (optional).
 - **Back matter:** Supplementary Materials, Acknowledgments, Author Contributions, Conflicts of Interest, **References**.
- **Review manuscripts** should comprise the **front matter**, literature review sections and the **back matter**. The template file can also be used to prepare the front and back matter of your review manuscript. It is not necessary to follow the remaining structure. Structured reviews and meta-analyses should use the same structure as research articles and ensure they conform to the **PRISMA** guidelines.
- **Graphical Abstract:**

A graphical abstract (GA) is an image that appears alongside the text abstract in the Table of Contents. In addition to summarizing the content, it should represent the topic of the article in an attention-grabbing way. Moreover, it should not be exactly the same as the Figure in the paper or just a simple superposition of several subfigures. Note that the GA must be original and unpublished artwork. Any postage stamps, currency from any country, or trademarked items should not be included in it.

The GA should be a high-quality illustration or diagram in any of the following formats: PNG, JPEG, TIFF, or SVG. Written text in a GA should be clear and easy to read, using one of the following fonts: Times, Arial, Courier, Helvetica, Ubuntu or Calibri.

The minimum required size for the GA is 560 × 1100 pixels (height × width). The size should be of high quality in order to reproduce well.
- **Acronyms/Abbreviations/Initialisms** should be defined the first time they appear in each of three sections: the abstract; the main text; the first figure or table. When defined for the first time, the acronym/abbreviation/initialism should be added in parentheses after the written-out form.
- **SI Units** (International System of Units) should be used. Imperial, US customary and other units should be converted to SI units whenever possible.
- **Accession numbers** of RNA, DNA and protein sequences used in the manuscript should be provided in the Materials and Methods section. Also see the section on **Deposition of Sequences and of Expression Data**.
- **Equations:** If you are using Word, please use either the Microsoft Equation Editor or the MathType add-on. Equations should be editable by the editorial office and not appear in a picture format.

- **Research Data and supplementary materials:** Note that publication of your manuscript implies that you must make all materials, data, and protocols associated with the publication available to readers. Disclose at the submission stage any restrictions on the availability of materials or information. Read the information about **Supplementary Materials** and Data Deposit for additional guidelines.
- **Preregistration:** Where authors have preregistered studies or analysis plans, links to the preregistration must be provided in the manuscript.
- **Guidelines and standards:** MDPI follows standards and guidelines for certain types of research. See https://www.mdpi.com/editorial_process for further information.

[\[Return to top\]](#)

Front Matter

These sections should appear in all manuscript types

- **Title:** The title of your manuscript should be concise, specific and relevant. It should identify if the study reports (human or animal) trial data, or is a systematic review, meta-analysis or replication study. When gene or protein names are included, the abbreviated name rather than full name should be used. Please do not include abbreviated or short forms of the title, such as a running title or head. These will be removed by our Editorial Office.
- **Author List and Affiliations:** Authors' full first and last names must be provided. The initials of any middle names can be added. The PubMed/MEDLINE standard format is used for affiliations: complete address information including city, zip code, state/province, and country. At least one author should be designated as corresponding author, and his or her email address and other details should be included at the end of the affiliation section. Please read the **criteria to qualify for authorship**.
- **Abstract:** The abstract should be a total of about 200 words maximum. The abstract should be a single paragraph and should follow the style of structured abstracts, but without headings: 1) Background: Place the question addressed in a broad context and highlight the purpose of the study; 2) Methods: Describe briefly the main methods or treatments applied. Include any relevant preregistration numbers, and species and strains of any animals used. 3) Results: Summarize the article's main findings; and 4) Conclusion: Indicate the main conclusions or interpretations. The abstract should be an objective representation of the article: it must not contain results which are not presented and substantiated in the main text and should not exaggerate the main conclusions.
- **Keywords:** Three to ten pertinent keywords need to be added after the abstract. We recommend that the keywords are specific to the article, yet reasonably common within the subject discipline.

Research Manuscript Sections

- **Introduction:** The introduction should briefly place the study in a broad context and highlight why it is important. It should define the purpose of the work and its significance, including specific hypotheses being tested. The current state of the research field should be reviewed carefully and key publications cited. Please highlight controversial and diverging hypotheses when necessary. Finally, briefly mention the main aim of the work and highlight the main conclusions. Keep the introduction comprehensible to scientists working outside the topic of the paper.
- **Materials and Methods:** They should be described with sufficient detail to allow others to replicate and build on published results. New methods and protocols should be described in detail while well-established methods can be briefly described and appropriately cited. Give the name and version of any software used and make clear whether computer code used is available. Include any pre-registration codes.
- **Results:** Provide a concise and precise description of the experimental results, their interpretation as well as the experimental conclusions that can be drawn.
- **Discussion:** Authors should discuss the results and how they can be interpreted in perspective of previous studies and of the working hypotheses. The findings and their implications should be discussed in the broadest context possible and limitations of the work highlighted. Future research directions may also be mentioned. This section may be combined with Results.
- **Conclusions:** This section is not mandatory but can be added to the manuscript if the discussion is unusually long or complex.
- **Patents:** This section is not mandatory but may be added if there are patents resulting from the work reported in this manuscript.

[\[Return to top\]](#)

Back Matter

- **Supplementary Materials:** Describe any supplementary material published online alongside the manuscript (figure, tables, video, spreadsheets, etc.). Please indicate the name and title of each element as follows Figure S1: title, Table S1: title, etc.
- **Funding:** All sources of funding of the study should be disclosed. Clearly indicate grants that you have received in support of your research work and if you received funds to cover publication costs. Note that some funders will not refund article processing charges (APC) if the funder and grant number are not clearly and correctly identified in the paper. Funding information can be entered separately into the submission system by the authors during submission of their manuscript. Such funding information, if available, will be deposited to FundRef if the manuscript is finally published. Please add: "This research received no external funding" or "This research was funded by [name of funder] grant number [xxx]" and "The APC was funded by [XXX]" in this section. Check carefully that the details given are accurate and use the standard spelling of funding agency names at <https://search.crossref.org/funding>, any errors may affect your future funding.

- **Acknowledgments:** In this section you can acknowledge any support given which is not covered by the author contribution or funding sections. This may include administrative and technical support, or donations in kind (e.g., materials used for experiments).
- **Author Contributions:** Each author is expected to have made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work; or have drafted the work or substantively revised it; AND has approved the submitted version (and version substantially edited by journal staff that involves the author's contribution to the study); AND agrees to be personally accountable for the author's own contributions and for ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work, even ones in which the author was not personally involved, are appropriately investigated, resolved, and documented in the literature.
For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used "Conceptualization, X.X. and Y.Y.; Methodology, X.X.; Software, X.X.; Validation, X.X., Y.Y. and Z.Z.; Formal Analysis, X.X.; Investigation, X.X.; Resources, X.X.; Data Curation, X.X.; Writing – Original Draft Preparation, X.X.; Writing – Review & Editing, X.X.; Visualization, X.X.; Supervision, X.X.; Project Administration, X.X.; Funding Acquisition, Y.Y.", please turn to the **CRediT taxonomy** for the term explanation. For more background on CRediT, see [here](#). **"Authorship must include and be limited to those who have contributed substantially to the work. Please read the section concerning the criteria to qualify for authorship carefully"**.
- **Institutional Review Board Statement:** In this section, please add the Institutional Review Board Statement and approval number for studies involving humans or animals. Please note that the Editorial Office might ask you for further information. Please add "The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of NAME OF INSTITUTE (protocol code XXX and date of approval)." OR "Ethical review and approval were waived for this study, due to REASON (please provide a detailed justification)." OR "Not applicable" for studies not involving humans or animals. You might also choose to exclude this statement if the study did not involve humans or animals.
- **Data Availability Statement:** In this section, please provide details regarding where data supporting reported results can be found, including links to publicly archived datasets analyzed or generated during the study. Please refer to suggested Data Availability Statements in section "**MDPI Research Data Policies**". You might choose to exclude this statement if the study did not report any data.
- **Conflicts of Interest:** Authors must identify and declare any personal circumstances or interest that may be perceived as influencing the representation or interpretation of reported research results. If there is no conflict of interest, please state "The authors declare no conflict of interest." Any role of the funding sponsors in the choice of research project; design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results must be declared in this section. *Membranes* does not publish studies funded partially or fully by the tobacco industry. Any projects funded by industry must pay special attention to the full declaration of funder involvement. If there is no role, please state "The sponsors had no role in the design, execution, interpretation, or writing of the study". For more details please see **Conflict of Interest**.

- **References:** References must be numbered in order of appearance in the text (including table captions and figure legends) and listed individually at the end of the manuscript. We recommend preparing the references with a bibliography software package, such as **EndNote**, **ReferenceManager** or **Zotero** to avoid typing mistakes and duplicated references. We encourage citations to data, computer code and other citable research material. If available online, you may use reference style 9. below.
- Citations and References in Supplementary files are permitted provided that they also appear in the main text and in the reference list.

In the text, reference numbers should be placed in square brackets [], and placed before the punctuation; for example [1], [1–3] or [1,3]. For embedded citations in the text with pagination, use both parentheses and brackets to indicate the reference number and page numbers; for example [5] (p. 10). or [6] (pp. 101–105).

The reference list should include the full title, as recommended by the ACS style guide. Style files for **Endnote** and **Zotero** are available.

References should be described as follows, depending on the type of work:

- **Journal Articles:**
 1. Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the article. *Abbreviated Journal Name* **Year**, *Volume*, page range.
- **Books and Book Chapters:**
 2. Author 1, A.; Author 2, B. *Book Title*, 3rd ed.; Publisher: Publisher Location, Country, Year; pp. 154–196.
 3. Author 1, A.; Author 2, B. Title of the chapter. In *Book Title*, 2nd ed.; Editor 1, A., Editor 2, B., Eds.; Publisher: Publisher Location, Country, Year; Volume 3, pp. 154–196.
- **Unpublished materials intended for publication:**
 4. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work (optional). Correspondence Affiliation, City, State, Country. year, *status* (*manuscript in preparation; to be submitted*).
 5. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work. *Abbreviated Journal Name* year, *phrase indicating stage of publication* (*submitted; accepted; in press*).
- **Unpublished materials not intended for publication:**
 6. Author 1, A.B. (Affiliation, City, State, Country); Author 2, C. (Affiliation, City, State, Country). Phase describing the material, year. (phase: Personal communication; Private communication; Unpublished work; etc.)
- **Conference Proceedings:**
 7. Author 1, A.B.; Author 2, C.D.; Author 3, E.F. Title of Presentation. In *Title of the Collected Work* (if available), Proceedings of the Name of the Conference, Location of Conference, Country, Date of Conference; Editor 1, Editor 2, Eds. (if available); Publisher: City, Country, Year (if available); Abstract Number (optional), Pagination (optional).
- **Thesis:**
 8. Author 1, A.B. Title of Thesis. Level of Thesis, Degree-Granting University, Location of University, Date of Completion.

- Websites:

9. Title of Site. Available online: URL (accessed on Day Month Year).

Unlike published works, websites may change over time or disappear, so we encourage you create an archive of the cited website using a service such as **WebCite**. Archived websites should be cited using the link provided as follows:

10. Title of Site. URL (archived on Day Month Year).

See the **Reference List and Citations Guide** for more detailed information.

[\[Return to top\]](#)

Preparing Figures, Schemes and Tables

- File for Figures and Schemes must be provided during submission in a single zip archive and at a sufficiently high resolution (minimum 1000 pixels width/height, or a resolution of 300 dpi or higher). Common formats are accepted, however, TIFF, JPEG, EPS and PDF are preferred.
- *Membranes* can publish multimedia files in articles or as supplementary materials. Please contact the editorial office for further information.
- All Figures, Schemes and Tables should be inserted into the main text close to their first citation and must be numbered following their number of appearance (Figure 1, Scheme I, Figure 2, Scheme II, Table 1, *etc.*).
- All Figures, Schemes and Tables should have a short explanatory title and caption.
- All table columns should have an explanatory heading. To facilitate the copy-editing of larger tables, smaller fonts may be used, but no less than 8 pt. in size. Authors should use the Table option of Microsoft Word to create tables.
- Authors are encouraged to prepare figures and schemes in color (RGB at 8-bit per channel). There is no additional cost for publishing full color graphics.

[\[Return to top\]](#)

Original Images for Blots and Gels Requirements

For the main text, please ensure that:

- All experimental samples and controls used for one comparative analysis are run on the same blot/gel.
- Image processing methods, such as adjusting the brightness or contrast, do not alter or distort the information in the figure and are applied to every pixel. High-contrast blots/gels are discouraged.
- Cropped blots/gels present in the main text retain all important information and bands.
- You have checked figures for duplications and ensured the figure legends are clear and accurate. Please include all relevant information in the figure legends and clearly indicate any re-arrangement of lanes.

In order to ensure the integrity and scientific validity of blots (including, but not limited to, Western blots) and the reporting of gel data, original, uncropped and unadjusted images should be uploaded as Supporting Information files at the time of initial submission.

A single PDF file or a zip folder including all the original images reported in the main figure and supplemental figures should be prepared. Authors should annotate each original image, corresponding to the figure in the main article or supplementary materials, and label each lane or loading order. All experimental samples and controls used for one comparative analysis should be run on the same blot/gel image. For quantitative analyses, please provide the blots/gels for each independent biological replicate used in the analysis.

[\[Return to top\]](#)

Supplementary Materials, Data Deposit and Software Source Code

MDPI Research Data Policies

MDPI is committed to supporting open scientific exchange and enabling our authors to achieve best practices in sharing and archiving research data. We encourage all authors of articles published in MDPI journals to share their research data. Individual journal guidelines can be found at the journal 'Instructions for Authors' page. Data sharing policies concern the minimal dataset that supports the central findings of a published study. Generated data should be publicly available and cited in accordance with journal guidelines.

MDPI data policies are informed by [TOP Guidelines](#) and [FAIR Principles](#).

Where ethical, legal or privacy issues are present, data should not be shared. The authors should make any limitations clear in the Data Availability Statement upon submission. Authors should ensure that data shared are in accordance with consent provided by participants on the use of confidential data.

MDPI data policies are informed by **TOP Guidelines** and **FAIR Principles**.

Where ethical, legal or privacy issues are present, data should not be shared. The authors should make any limitations clear in the Data Availability Statement upon submission. Authors should ensure that data shared are in accordance with consent provided by participants on the use of confidential data.

Data Availability Statements provide details regarding where data supporting reported results can be found, including links to publicly archived datasets analyzed or generated during the study.

Below are suggested Data Availability Statements:

- Data available in a publicly accessible repository
The data presented in this study are openly available in [repository name e.g., FigShare] at [**doi**], reference number [reference number].
- Data available in a publicly accessible repository that does not issue DOIs
Publicly available datasets were analyzed in this study. This data can be found here: [link/accession number]
- Data available on request due to restrictions eg privacy or ethical
The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to [insert reason here]
- 3rd Party Data
Restrictions apply to the availability of these data. Data was obtained from [third party] and are available [from the authors / at URL] with the permission of [third party].
- Data sharing not applicable
No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.
- Data is contained within the article or supplementary material
The data presented in this study are available in [insert article or supplementary material here]

Data citation:

[dataset] Authors. Year. Dataset title; Data repository or archive; Version (if any); Persistent Identifier (e.g., DOI).

Computer Code and Software

For work where novel computer code was developed, authors should release the code either by depositing in a recognized, public repository such as **GitHub** or uploading as supplementary information to the publication. The name, version, corporation and location information for all software used should be clearly indicated. Please include all the parameters used to run software/programs analyses.

Supplementary Material

Additional data and files can be uploaded as "Supplementary Files" during the manuscript submission process. The supplementary files will also be available to the referees as part of the peer-review process. Any file format is acceptable; however, we recommend that common, non-proprietary formats are used where possible.

References in Supplementary Files

Citations and References in Supplementary files are permitted provided that they also appear in the reference list of the main text.

Unpublished Data

Restrictions on data availability should be noted during submission and in the manuscript. "Data not shown" should be avoided: authors are encouraged to publish all observations related to the submitted manuscript as Supplementary Material. "Unpublished data" intended for publication in a manuscript that is either planned, "in preparation" or "submitted" but not yet accepted, should be cited in the text and a reference should be added in the References section. "Personal Communication" should also be cited in the text and reference added in the References section. (see also the MDPI reference list and citations style guide).

Remote Hosting and Large Data Sets

Data may be deposited with specialized service providers or institutional/subject repositories, preferably those that use the DataCite mechanism. Large data sets and files greater than 60 MB must be deposited in this way. For a list of other repositories specialized in scientific and experimental data, please consult [databib.org](https://data.bib.org) or re3data.org. The data repository name, link to the data set (URL) and accession number, doi or handle number of the data set must be provided in the paper. The journal **Data** also accepts submissions of data set papers.

Deposition of Sequences and of Expression Data

New sequence information must be deposited to the appropriate database prior to submission of the manuscript. Accession numbers provided by the database should be included in the submitted manuscript. Manuscripts will not be published until the accession number is provided.

- *New nucleic acid sequences* must be deposited in one of the following databases: **GenBank**, **EMBL**, or **DBJ**. Sequences should be submitted to only one database.
- *New high throughput sequencing (HTS) datasets* (RNA-seq, ChIP-Seq, degradome analysis, ...) must be deposited either in the **GEO database** or in the NCBI's **Sequence Read Archive (SRA)**.
- *New microarray data* must be deposited either in the **GEO** or the **ArrayExpress** databases. The "Minimal Information About a Microarray Experiment" (MIAME) guidelines published by the Microarray Gene Expression Data Society must be followed.
- *New protein sequences* obtained by protein sequencing must be submitted to UniProt (submission tool **SPIN**). Annotated protein structure and its reference sequence must be submitted to **RCSB of Protein Data Bank**.

All sequence names and the accession numbers provided by the databases must be provided in the Materials and Methods section of the article.

Deposition of Proteomics Data

Methods used to generate the proteomics data should be described in detail and we encourage authors to adhere to the **"Minimum Information About a Proteomics Experiment"**. All generated mass spectrometry raw data must be deposited in the appropriate public database such as **ProteomeXchange**, **PRIDE** or **JPOST**. At the time of submission, please include all relevant information in the materials and methods section, such as repository where the data was submitted and link, data set identifier, username and password needed to access the data.

[\[Return to top\]](#)

Research and Publication Ethics

Research Ethics

Research Involving Human Subjects

When reporting on research that involves human subjects, human material, human tissues, or human data, authors must declare that the investigations were carried out following the rules of the Declaration of Helsinki of 1975 (<https://www.wma.net/what-we-do/medical-ethics/declaration-of-helsinki/>), revised in 2013. According to point 23 of this declaration, an approval from the local institutional review board (IRB) or other appropriate ethics committee must be obtained before undertaking the research to confirm the study meets national and international guidelines. As a minimum, a statement including the project identification code, date of approval, and name of the ethics committee or institutional review board must be stated in Section 'Institutional Review Board Statement' of the article.

Example of an ethical statement: "All subjects gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee of XXX (Project identification code)."

For non-interventional studies (e.g. surveys, questionnaires, social media research), all participants must be fully informed if the anonymity is assured, why the research is being conducted, how their data will be used and if there are any risks associated. As with all research involving humans, ethical approval from an appropriate ethics committee must be obtained prior to conducting the study. If ethical approval is not required, authors must either provide an exemption from the ethics committee or are encouraged to cite the local or national legislation that indicates ethics approval is not required for this type of study. Where a study has been granted exemption, the name of the ethics committee which provided this should be stated in Section 'Institutional Review Board Statement' with a full explanation regarding why ethical approval was not required.