

## PLANO DE TRABALHO 2

**PROJETO DE PESQUISA:** Uso do extrato alcoólico do *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) na bioengenharia tecidual óssea

### 1. OBJETIVOS

#### Objetivo geral:

Avaliar o potencial osteoindutor do extrato alcoólico do *C. ambrosioides* (mastruz)

#### Objetivos específicos:

- a) Avaliar a capacidade das células pré-osteogênicas se diferenciarem em osteoblastos maduros e sintetizarem uma matriz osteóide quando cultivadas na presença do extrato alcoólico do *C. ambrosioides* (mastruz)
- b) Estudar a resposta *in vivo* do tecido ósseo em contato com o extrato alcoólico do *C. ambrosioides* (mastruz)
- c) Avaliar o potencial osteoreparador do extrato alcoólico do *C. ambrosioides* (mastruz), quando implantado em um defeito ósseo.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1. Estudo in vivo

##### 2.1.1 Preparo do extrato de *C. ambrosioides*

Para o preparo dos extratos, após a coleta as folhas serão secas em estufa de circulação forçada de ar a temperatura média de 50°C e após secas, serão moídas em moinho mecânico. Após pesagem do material desidratado será feita mistura em volumes de solução metanol 70% e mantido em temperatura de geladeira (média  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) por período de 48 horas, que após filtração, procederá evaporação do solvente presente no filtrado em evaporador rotativo sob temperatura ao redor de 45°C. O peso seco dos extratos será determinado em recipientes preparados com folhas de alumínio que previamente pesados receberá volume de 1 mL do extrato, e colocados sobre chapa aquecida para evaporação do solvente. Serão feitas pesagens a cada meia hora, sendo que após três pesagens com valores iguais será calculado o peso seco do extrato (Betoni et al, 2006). Os extratos serão transformados em discos de gel de hidroxietilcelulose (natrosol).

##### 2.1.2 Amostra selecionada

Constituída de 15 ratos (Wistar), machos, de 3 meses de vida. Eles serão mantidos em condições controladas de temperatura ( $24^{\circ}\text{C} \pm 2$ ), períodos de luz de 12H, e com livre acesso a água e ração comercial.

### 2.1.3 Procedimento cirúrgico

Uma anestesia geral será induzida através de uma injeção intra-peritoneal de Ketamina/Xilazina (80/10 mg/kg). Uma tricotomia será realizada, seguida por uma assepsia com PVPI tópico. A calvaria será exposta por uma incisão reta ao longo da linha sargital, o periósteo descolado e o osso exposto para o procedimento. Para os grupos 1, 2 e 3 será realizado um defeito crítico através de uma osteotomia com uma broca trefina de 8mm de diâmetro, numa rotação de 1.300 rpm, sob irrigação com soro fisiológico, no centro da calvaria. Para o grupo 1, controle, nada será implantado, no grupo 2 será implantado o veículo gel de natrosol e no grupo 3 será implantado o gel de C. ambrosioides. O pós-operatório será administrado 0,5 a 1,0 mg/Kg, de flunixin meglumine, via SC, de 12/12 horas como analgésico. As suturas serão removidas no sétimo dia.

### 2.1.4 Sacrifícios dos animais e processamento das amostras

Os animais serão sacrificados 120 dias com uma dose letal de Ketamina (seguindo a ISO-10993-6). As amostras serão dissecadas e fixadas por 24H em paraformaldeído a 4% a 4°C e seguido dos procedimentos de histológicos padrão para desmineralização e inclusão em parafina. Serão realizados cortes histológicos de 5um de espessura, seguido de uma coloração de Tricromo de Masson.

### 2.1.5 Análise histomorfométrica

A análise de quantidade de tecido ósseo neoformado será realizada por planimetria. Para a contagem de pontos será utilizado um sistema padrão composto com um retículo de 25 pontos, resultante das intersecções entre as linhas horizontais e verticais, o qual será sobreposto à imagem histológica observada em um aumento de 400X. (RGO - Rev Gaúcha Odontol., Porto Alegre, v. 58, n. 4, p. 491-496, out./dez. 2010 P VICENTE NETO et al. 93) A quantidade de tecido ósseo neoformado, em porcentagem de área, será obtida pela razão entre os números de pontos incidentes no tecido e o número total de pontos no retículo. Para a análise histomorfométrica os dados serão submetidos à análise de variância (ANOVA) e em seguida, ao Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para a análise histológica dos resultados, será observada a presença de exsudato, células inflamatórias e clásticas, e, neoformação tanto de fibras colágenas quanto de tecido ósseo.

## 3. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

As atividades a serem realizadas pelo bolsista 2 são:

- AT1. Revisão bibliográfica;
- AT2. Cultura primária de osteoblastos de calvária de rato
- AT3. Relatório parcial
- AT4. Teste de osteoindução *in vivo*
- AT5. Avaliação histomorfométrica

[illegible]