

PLANO DE TRABALHO 1

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 vitro* 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 vitro

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 Cultura celular

Células osteogênicas serão isoladas a partir de uma digestão enzimática do osso de calvária de camundongos recém-nascido (2dias) do tipo swiss/balboo, como descrito previamente (Nanci A 1996, De Oliveira PT 2003, De oliveira PT 2004). As células serão semeadas em sobre os discos do geopolímero Bioalk colocados em placas de poliestireno de 24 poços, numa densidade de 20.000 células/poço. As células serão

cultivadas por até 15 dias utilizando o meio de cultura α -MEM com L-glutamina, acrescido de 10% de soro fetal bovino, 7 mM β -glicerolfosfato, 5 μ g/mL ácido ascórbico, e 50 μ g/mL gentamicina, à 37°C numa atmosfera umidificada com 5% de CO₂. O meio de cultura será trocado a cada 3 dias. A progressão da cultura será examinada por microscopia de contraste de fase para avaliar o crescimento celular.

2.1.3 Curva de Crescimento e Viabilidade Celular

Nos tempos D4, D7 e D11 o crescimento celular será avaliado. As células serão descoladas enzimaticamente do substrato de cultura utilizando 1mM de EDTA, 1,3mg/ml de colagenase, e 0,25% de solução de tripsina. O número total de células/poço e a porcentagem de células viáveis e não viáveis serão determinadas depois de uma marcação com Azul de Trypan usando um hemacitômetro.

2.1.4 Formação de nódulos ósseos in vitro

No dia 15, as culturas serão fixadas com paraformaldeído a 4% (pH 7,2) por 2H a temperatura ambiente. As amostras serão lavadas numa solução tampão, desidratadas em grau crescente de álcool e marcadas com vermelho de Alizarina a 2% por 8 min a temperatura ambiente. Elas serão fotografadas para avaliar a porcentagem de disco do gel ocupado pelos nódulos marcados pelo vermelho de Alizarina. Será utilizada uma escala de ausência (0), pequena (1), moderada (2) e grande (3).

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 1 são

- AT1. Revisão bibliográfica;
- AT2. Obtenção de extrato de *C. ambrosioides*
- AT3. Relatório parcial
- AT4. Teste de osteoindução *in vitro*
- AT5. Avaliação histomorfométrica

[illegible]