



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA  
E BIOQUÍMICA**



**Potencial de Diferenciação Óssea das  
Células-Tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo Humano Associadas à  
Nanopartículas de Dióxido de Titânio**

**Aluno: Isabela Lemos de Lima**

**Orientador: Dra. Vivian Alonso Goulart**

**Co-Orientador: Dra. Letícia de Souza Castro Filice**

**UBERLÂNDIA - MG  
2017**



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA  
E BIOQUÍMICA**



**Potencial de Diferenciação Óssea das  
Células-Tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo Humano Associadas à  
Nanopartículas de Dióxido de Titânio**

**Aluno: Isabela Lemos de Lima**

**Orientador: Dra. Vivian Alonso Goulart**

**Co-Orientador: Dra. Leticia de Souza Castro Filice**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Uberlândia como parte dos  
requisitos para obtenção do  
Título de Mestre em Genética e  
Bioquímica (Área Genética)**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

L732p  
2018

Lima, Isabela Lemos de, 1990  
Potencial de diferenciação óssea das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano associadas à nanopartículas de dióxido de titânio / Isabela Lemos de Lima. - 2018.  
44 f. : il.

Orientadora: Vivian Alonso Goulart.

Coorientadora: Letícia de Souza Castro Filice.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.721>

Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Células-tronco - Teses. 3. Tecido adiposo - Teses. 4. Dióxido de titânio - Teses. I. Goulart, Vivian Alonso. II. Filice, Letícia de Souza Castro, 1973 . III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

---

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Potencial de Diferenciação Óssea das  
Células-Tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo Humano Associadas à  
Nanopartículas de Dióxido de Titânio**

**ALUNO: Isabela Lemos de Lima**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Dra. Vivian Alonso Goulart

**Examinadores:** Dra Lorraine Braga Ferreira  
Dra Lara Vecchi

**Data da Defesa:** \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

\_\_\_\_\_  
(NOME DO ORIENTADOR)

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais Joel e Jomara que sempre me incentivam e ajudam em todas as minhas jornadas.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e pela oportunidade de fechar mais um ciclo de aprendizado.

Agradeço imensamente a paciência, dedicação e disposição das minhas orientadoras Dra. Vivian Alonso Goulart e Dra. Letícia de Castro Felice. Ter vocês em minha vida é uma grande benção! Agradeço também ao meu Grupo de pesquisa GEP-CT por todo aprendizado, ajuda e incentivo.

Agradeço o apoio incondicional do meu pai e minha mãe que são os maiores incentivadores das minhas jornadas, que nunca medem esforços para me ajudar em tudo. E agradeço também o apoio da minha avó Dalci, meu irmão Joel Filho e do meu noivo Bruno.

Agradeço aos meus amigos, do laboratório de Nanobiotecnologia-UFU e da vida, por todo apoio, principalmente a Sara, Patrícia, Cristiane e Bárbara. Sem o incentivo e a ajuda de vocês eu não teria conseguido.

## Lista de Abreviaturas

CTM	Células-tronco mesemquimais
CTM-TAs	Células-tronco mesemquimais do tecido adiposo
DMEM	Dulbecco Minimum Essential Media
FA	Fosfatase Alcalina
iPS	Células-tronco pluripotentes induzidas
<i>ISCT</i>	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
MHCs	Complexo de histocompatibilidade principal
NPs	Nanopartículas
PBH-BHA	Poli-beta-hidroxibutirato-poli beta-hidroxibutirato-co-valerato
PBS	Tampão Fosfato
SFB	Soro fetal bovino
TiO <sub>2</sub>	Dióxido de Titânio

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1 - Fração de tamanho e peso de anatase, fração ponderal de rutila e fração ponderal de brookita dos NC de TiO <sub>2</sub> submetidos a recozimento térmico a 100° C / 24h, 500° C / 1h, 650° C / 1h e 800° C / 1h.....	18
---	----



## Lista de Figuras

Figura 1 - Esquematização do isolamento não-enzimático de CTM-TAs padronizado no Laboratório de Nanobiotecnologia- UFU .....	13
Figura 2 - Células-tronco mesenquimais isoladas pela metodologia não-enzimática de tecido adiposo humano em terceira passagem. A: CTM-TAs no aumento 4X. B: CTM-TAs no aumento 10X. C: CTM-TAs no aumento 20X .....	16
Figura 3 - Análise por citometria de fluxo dos marcadores específicos de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano. A: CD14 E CD184, B: CD90, CD45 .....	17
Figura 4 - Padrões XRD das amostras sujeitas a técnicas de recozimento a 100°C / 24h, 500°C / 1h, 650°C / 1h e 800°C / 1h .....	18
Figura 5 - Espectro Micro Raman de NCO de TiO <sub>2</sub> sujeitos a 100°C / 24h, 500°C / 1h, 650°C / 1h e 800°C / 1h.....	20
Figura 6 - Quantificação da Enzima Fosfatase Alcalina em Unidades por litro após 7 dias do tratamento das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano. ....	22
Figura 7 - Quantificação da Enzima Fosfatase Alcalina em Unidades por litro após 14 dias do tratamento das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano. ....	23
Figura 8 - Quantificação da Enzima Fosfatase Alcalina em Unidades por litro após 21 dias do tratamento das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano. ....	24

Figura 9 - Quantificação da mineralização da matriz celular utilizando o corante Vermelho de Alizarina após 07 dias do tratamento das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano.....	25
Figura 10 - Quantificação da mineralização da matriz celular utilizando o corante Vermelho de Alizarina após 14 dias de tratamento das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano.....	26
Figura 11 - Quantificação da mineralização da matriz celular utilizando o corante Vermelho de Alizarina após 21 dias de tratamento das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano.....	27
Figura 12 - Registros de Microscopia óptica das células cultivadas com DMEM baixa glicose (controle), DMEM Osteogênico e DMEM Osteogênico com nanopartículas de TiO <sub>2</sub> (aumento 10X) .....	28



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA  
E BIOQUÍMICA



## Sumário

Resumo .....	1
Abstract .....	2
1.2 - Células-Tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo (CTM-TAs).....	5
1.3- Diferenciação óssea.....	7
1.4- Nanopartículas de Dióxido de Titânio (TiO <sub>2</sub> ).....	9
1- Objetivos Gerais .....	10
3- Material e Métodos .....	11
4.1- Isolamento e Caracterização das CTMs.....	11
4.2- Síntese e caracterização das Nanopartículas de dióxido de titânio.....	13
4.3- Quantificação da Enzima Fosfatase Alcalina (FA) .....	13
4.4- Análise microscópica e quantificação da mineralização a partir da diferenciação osteogênica in vitro .....	14
4.5- Análises Estatísticas.....	14
4- Resultados e Discussão .....	15
5.1- Isolamento e Caracterização das CTM-TAs.....	15
5.3- Quantificação da Enzima Fosfatase Alcalina (FA) .....	20
5.4- Quantificação e Análise da mineralização a partir da diferenciação osteogênica in vitro .....	23
6- Referências .....	28



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA  
E BIOQUÍMICA



### Resumo

As Células-Tronco Mesenquimais do Tecido adiposo são multipotentes, e se diferenciar em células da linhagem mesodermal. Devido a facilidade de obtenção do tecido adiposo e grande rendimento de células-tronco, onde essas células têm sido muito utilizadas para estudos em aplicação clínica e engenharia de tecidos, principalmente na regeneração óssea. A Nanotecnologia também é grande aliada para engenharia de tecidos, nanopartículas e nanoestruturas mostram-se promissoras para o reparo ósseo. Desta forma, este trabalho visou avaliar o potencial de Nanopartículas de Dióxido de Titânio ( $\text{TiO}_2$ ) na influência da diferenciação óssea. CTM-TAs foram isoladas não-enzimaticamente de material lipoaspirado, e caracterizadas por citometria de fluxo. Então as CTM-TAs foram separadas em três grupos: Controle (cultivadas com meio DMEM baixa glicose), Meio Osteogênico (Cultivadas com meio DMEM suplementado com  $\beta$ -glicerofosfato, ácido ascórbico e dexametasona) e Meio Osteogênico com Nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  (cultivadas com meio DMEM osteogênico acrescido de nanopartículas sintetizadas a temperatura de  $650^\circ\text{C}$  na concentração de  $5\mu\text{g/ml}$ , previamente caracterizadas). Os grupos foram testados quanto a quantificação da enzima Fosfatase Alcalina (FA) e a deposição do corante Vermelho de Alizarina sobre a matriz mineralizada aos 7, 14 e 21 dias. Aos 7 dias não foi observada quantidade considerável de FA em nenhum dos grupos, bem como o corante Vermelho de Alizarina se manteve baixo. Aos 14 dias a quantificação tanto de FA quando do corante dos grupos tratados com Meio Osteogênico com e sem nanopartículas aumentaram em relação ao grupo controle, mas não apresentaram diferença entre si, e já foi possível observar focos de mineralização. Aos 21 dias as quantificações dos dois grupos também aumentaram quando comparados com o controle, mas o grupo tratado com as nanopartículas apresentou um aumento significativo macro e microscopicamente. Assim estes resultados sugerem que as NPs de  $\text{TiO}_2$  podem influenciar positivamente aumentando o processo de regeneração óssea.

**Palavras-chave:** Células-tronco, tecido adiposo, nanopartículas, dióxido de titânio

**Abstract**

Adipose derived mesenchymal stem cells are multipotent cells capable of differentiating into cells of the mesodermal lineage. Because of easy retrieval of adipose tissue and high yield of stem cells, this tissue has been used for many studies in clinical application and tissue engineering, mainly to bone regeneration. Nanotechnology has been used for tissue engineering too, where nanoparticles and nanostructures are promising for bone repair. In this way, this work aimed to evaluate the potential of Titanium Dioxide Nanoparticles (TiO<sub>2</sub>) to influence bone differentiation. CTM-TAs were isolated non-enzymatically from lipoaspirate material, and characterized. After were separated into three groups: Control (cultured with DMEM low glucose medium), Osteogenic Medium (Cultivated with DMEM medium supplemented with β-glycerophosphate, ascorbic acid and dexamethasone) and Osteogenic Medium with TiO<sub>2</sub> Nanoparticles (osteogenic DMEM plus synthesized nanoparticles at 650 ° C at the concentration of 5 µg / ml, previously characterized). The groups were submitted to quantification of Alkaline Phosphatase enzyme (ALP) and Alizarin Red deposition on the mineralized matrix at 7, 14 and 21 days. In the first time no signification difference of ALP was observed in any of the groups, and Alizarin Red remained low. Macroscopically and Microscopically it was not possible to observe deposition. At 14 days the quantification of both groups, Osteogenic Medium with and without nanoparticles, increased ALP and Alizarin Red compared with the control group, but they did not show any difference between them. At 21 days, the measurements of the two tests also increased, but the group treated with the nanoparticles showed better results. Thus, these results suggest that TiO<sub>2</sub> NPs influence the bone regeneration process.

**Key words:** Stem cells, adipose tissue, nanoparticles, titanium dioxide

## 1- Introdução

### 1.1- Células-Tronco

Os estudos pioneiros que elucidaram a natureza das células-tronco se deram entre 1960 e 1980, quando cientistas observaram a capacidade de regeneração do sistema imune em camundongos que receberam transplante de medula óssea e depois conseguiram cultivar células de blastocisto de embriões do camundongo *in vitro*. Posteriormente em 1998 conseguiu-se isolar células-tronco de embriões humanos. Todos estes estudos abriram portas para o entendimento da capacidade destas células e novos caminhos para aplicação no tratamento de doenças, ocupando hoje papel de destaque nas pesquisas mundiais (ALVES A., 2014; ULLAH et al., 2015).

Células-tronco são células indiferenciadas que têm como características intrínsecas a auto renovação, através da divisão celular, e plasticidade, onde exibem capacidade de diferenciar em várias linhagens celulares, não possuindo marcadores tecido-específico (FRIEDENSTEIN et al., 1976; TILL e MCCULLOCH, 1980; MORRISON et al., 1997; WEISSMAN, 2000). Estas células não são apenas unidades básicas de organização biológica, mas também são responsáveis por manter o desenvolvimento e regeneração de tecidos e órgãos. Na maioria, se não em todos os tecidos adultos, são encontradas populações de células-tronco, que podem se multiplicar e diferenciar de acordo com a necessidade daquele tecido. Elas atuam mantendo a integridade do tecido reparando-o ou remodelando-o, podendo manter-se em estado de quiescência até a fase adulta, ou diferenciar-se em tecidos específicos a partir da expressão de alguns genes (VERÔNICA FERREIRA DE SOUZA, 2003; ZAGO M. A., 2006).

As células-tronco são classificadas de acordo com a sua capacidade de diferenciação em: totipotentes (embrionárias), pluripotentes (trofoblásticas), multipotentes (adultas) e unipotentes (BJORN BEHR, 2010; SOBHANI et al., 2017). As células-tronco totipotentes são capazes de originar tanto um organismo como todo, como qualquer tipo celular, incluindo células do sistema nervoso central e periférico. Estas células são encontradas no embrião recém-formado e têm potencial para originar até mesmo as células do folheto extraembrionário que formarão a placenta, porém estas células são temporárias, desaparecendo em

pouco tempo após a fertilização (GAGE, 2000; ROBEY, 2000). Já as células-tronco pluripotentes são capazes de diferenciarem em todos os tipos celulares dos três folhetos embrionários (mesoderma, endoderma e ectoderma), enquanto as multipotentes são células adultas que podem originar todos os tipos de células de um único folheto embrionário específico. As células unipotentes são capazes de diferenciarem em um único tipo celular (JAENISCH e YOUNG; BARRY, 2003; REVEL, 2009).

As células-tronco podem ser também classificadas de acordo com a sua origem, em: embrionárias, adultas e induzidas. As embrionárias podem ser células totipotentes ou pluripotentes isoladas de um embrião inicial de mamíferos. Em cultura, essas células dão origem a uma linhagem que se mantém indiferenciadas, o que as torna importante ferramenta para pesquisa e promissora para transplante de tecidos. Trabalhar com estas células *in vitro* significa que o embrião ficará destruído, por isso foi e ainda é muito discutida a questão ética em torno do uso deste tipo de célula-tronco. A lei de biossegurança n. 11.105/2005 dita critérios para a utilização em pesquisa. Além disso, existem algumas dificuldades quanto ao controle da alta capacidade de proliferação destas células que podem formar teratomas (BRASIL; VERÔNICA FERREIRA DE SOUZA, 2003; ZAGO M. A., 2006; MORAES, 2008; EVANS, 2011; Types of Stem Cells, 2015).

As células-tronco pluripotentes induzidas (IPS) são células adultas específicas de tecidos, manipuladas em laboratório para se comportarem como células-tronco pluripotentes. Em 2006 os pesquisadores Takahashi e Yamanaka avançaram nas pesquisas com células-tronco, descobrindo que a pluripotência poderia ser induzida em células somáticas, utilizando quatro fatores de transcrição embrionários (OCT4, SOX2, NANOG e LIN28), que foram suficientes para reprogramá-las. Elas apresentam cariótipos normais, atividade de telomerase expressa, marcadores de superfície celular e genes que caracterizam células-tronco embrionárias humanas e mantêm o potencial de desenvolvimento para se diferenciar em células das três camadas primárias germinativas. Existem muitas pesquisas que estão experimentando maneiras alternativas de criar iPS para que elas possam ser usadas como fonte de células ou tecidos para tratamentos

médicos, produção de novos modelos de doenças e desenvolvimento de medicamentos (YU et al., 2007; Types of Stem Cells, 2015; WILSON e WU, 2015).

Já as célula-tronco adultas ou somáticas estão presentes em praticamente todos os tecidos, sendo responsáveis pela manutenção dos tecidos e órgãos. Elas exibem baixa capacidade proliferativa, localizando-se em regiões específicas para manter o seu desenvolvimento e as suas características (YU et al., 2007; Types of Stem Cells, 2015). Os tecidos mais comuns onde isolam-se esse tipo de célula-tronco são: medula óssea, sangue periférico, tecido adiposo e sangue do cordão umbilical (ZAGO M. A., 2006).

Na medula óssea podemos encontrar mais de um tipo de população de células-tronco, sendo eles: as células-tronco hematopoiéticas, as células-tronco endoteliais e as células-tronco mesenquimais. As células-tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais são as mais estudadas. As hematopoiéticas são multipotentes, podendo diferenciarem-se em todas as células funcionais do sangue, de forma a manter o equilíbrio necessário entre diferenciação e não-diferenciação, de acordo com a necessidade do tecido sanguíneo que está em constante renovação (MORAES, 2008; SEITA e WEISSMAN, 2010).

As células-tronco mesenquimais (CTMs) podem ser isoladas de várias fontes humanas e animais, não só da medula óssea. Na década de 70 foi feita pela primeira vez a descrição de células-tronco mesenquimais multipotentes, onde os trabalhos de Friedenstein e colaboradores mostraram que células da medula óssea são capazes de diferenciarem em osteoblastos (FRIEDENSTEIN et al., 1976). Já o termo célula-tronco mesenquimal foi introduzido por Caplan em 1991 ao demonstrar que tais células, isoladas de tecido adulto ou embrionário, são capazes de diferenciar em condrócitos e osteoblastos, células de origem mesodermal (CAPLAN, 1991; PITTENGER et al., 1999) .

## **1.2 - Células-Tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo (CTM-TAs)**

As CTMs foram originalmente isoladas da medula óssea, mas recentemente tem sido identificadas em outros tecidos, como tecido adiposo, epiderme e cordão umbilical (MARKARIAN et al., 2014), fígado fetal (ZHANG et al., 2005), pulmão fetal (ZHENG et al.), placenta (FUKUCHI et al., 2004), endométrio (SCHWAB et al.,



2008), ligamento periodontal (PARK et al., 2011), polpa dentária (ZUK et al., 2002), membrana sinovial (HERMIDA-GOMEZ et al., 2011), osso compacto e trabecular (SAKAGUCHI et al., 2004; ZHU et al., 2010).

A *International Society for Cellular Therapy (ISCT)*, determina como três os requisitos mínimos para uma população de células-tronco ser classificada como Mesenquimal. Primeiramente as CTMs devem ser aderentes ao plástico, quando cultivadas usando garrafas de cultura celular. O segundo requisito é que sigam os critérios de presença dos marcadores CD13, CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD166, STRO-1 e ausência dos marcadores CD14, CD31, CD34, CD45, CD184. Por fim, as células devem ter capacidade de diferenciarem-se em osteócitos, adipócitos e condrócitos, como já descrito anteriormente (DOMINICI et al., 2006; P et al., 2011; GU et al., 2015).

As CTMs apresentam também capacidade de modulação das respostas imunes. As lesões teciduais normalmente são acompanhadas por inflamação, que via mediadores quimiotáticos, mobilizam e direcionam as CTMs aos locais danificados. As CTMs além do reparo tecidual atuam liberando fatores de crescimento preparando o microambiente nos arredores da lesão. Este processo é conhecido como “*crosstalk*” entre CTMs e respostas imunes e apresenta grande potencial para aplicação clínica, como já estudado no tratamento de doenças como defeitos ósseos e de cartilagem, infarto do miocárdio e doenças autoimunes. Recentemente, os pesquisadores descobriram que as CTMs secretam vários fatores solúveis que exercem efeitos imunossupressores, modulando tanto as respostas imunes inatas (macrófagos, células dendríticas e NK), quanto as adaptativas (células B e células T CD4 + e CD8 +) (Bassi et al 2012). (MA et al., 2014). As CTMs apresentam baixa imunogenicidade e são consideradas “privilegiadas imunologicamente”, pois expressam um nível relativamente baixo de complexo de histocompatibilidade principal (MHCs) de classe I e II da superfície celular e não têm a expressão superficial de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86 e CD40), que são necessárias para ativar completamente as células T. Mais importante ainda, alguns fatores imunorreguladores ativos secretados por CTMs regulam as reações imunológicas tanto das células, como dos tecidos circundantes (YANG et al., 2017).

Muitos pesquisadores têm registrado que o tecido adiposo é uma fonte abundante de células estromais multipotentes, de forma que seu uso tem sido mais frequente, pois esse material é rotineiramente descartado após a cirurgias de abdominoplastia e lipoaspiração. A coleta deste tecido é realizada por métodos menos invasivos com obtenção de maior quantidade de células que na coleta da medula óssea, além de possibilitar fácil isolamento e expansão em cultura das mesmas. Entre essas pesquisas existem muitos resultados envolvendo a diferenciação óssea destas células, com grande aplicação clínica para regeneração óssea (ZUK et al., 2002; HEO et al., 2016).

### **1.3- Diferenciação óssea**

O tecido ósseo é um tecido que cumpre papel significativo e dinâmico, dando suporte ao tecido conjuntivo. Faz papel de alicerce, é responsável pela proteção, locomoção e suporte de carga. Além disso, também assume a responsabilidade pela hematopoiese, a homeostase mineral e outras funções. Este tecido continua a se remodelar e se reconstruir ao longo da vida de um indivíduo de forma espontânea, de acordo com a demanda, ou quando ocorrem grandes defeitos ósseos decorrentes de trauma, infecções, ressecção tumoral e anormalidades esqueléticas (ROMAGNOLI e BRANDI, 2014; YI et al., 2016).

O processo de osteopoiese envolve a proliferação e maturação de células precursoras primitivas em osteoblastos funcionais. As células ósseas supostamente são originárias de células estaminais mesenquimais que se comprometem com a linhagem celular osteogênica tornando-se Células osteoprogenitoras, pré-osteoblastos, osteoblastos e osteócitos (LONG, 2001). Desta forma CTM-TAs isoladas estão sendo utilizadas para reparo ósseo, por exemplo para reconstrução de maxila após recorrência de ameloblastoma. A reconstrução pode ser realizada aliando CTM-TAs com *scaffolds* proteicos(SÁNDOR et al., 2013). Há relatos também de reparo de defeitos de calvária, após traumatismo craniano, utilizando CTM-TAs autólogas fixadas no local da lesão com cola de fibrina (LENDECKEL et al., 2004).

O osso apresenta em sua estrutura partes que vão da escala micro a escala nano, onde existem partes subunitárias com 200µm, fibras colágenas com 200nm e plaquetas de Hidróxiapatita (HA) DE 20 nm. Além disso existem estudos associando biomateriais e nanomateriais com CTM-TAs. Foram aplicados vários nanocompósitos, materiais e partículas para imitar o crescimento do osso além de vários avanços em *nanoscaffolds* para diminuir as reações auto-imunes e manter o controle sobre infecções microbianas (WANG et al., 2016; YI et al., 2016).

Além disso existem estudos associando biomateriais e nanomateriais com CTM-TAs. Foram aplicados vários nanocompósitos, materiais e partículas para imitar o crescimento do osso além de vários avanços em *nanoscaffolds* para diminuir as reações auto-imunes e manter o controle sobre infecções microbianas (YI et al., 2016). Estudos com nanopartículas de ouro têm apresentado resultados positivos para a regeneração óssea, devido aos seus efeitos não tóxicos e estimulantes na diferenciação das CTM-TAs. Foram investigados os efeitos de *scaffolds* de quitosana conjugada com nanopartículas de ouro como um fator determinante da indução das MSCs em osteoblastos, relacionando a estimulação mecânica como regulador para ativação da via de sinalização catenina/Wnt para a mineralização (CHOI et al., 2015). Rosila et al (2016) fizeram um estudo para avaliar o potencial osteogênico das CTM-TAs co-cultivadas com osteoblastos em *scaffolds* poliméricos de PHB-BHA (poli beta- hidroxibutirato-poli beta hidroxibutirato-co-valerato). Foram testadas culturas só de células-tronco sobre o *scaffold* como controle, e proporções diferentes de células tronco e osteoblastos sobre o *scaffold*. Esse tipo de esqueleto polimérico foi anteriormente apontado como fator influenciador positivo na diferenciação óssea sendo confirmado com estes experimentos. Tanto o *scaffold* com células-tronco, quanto com a co-cultura apresentaram bons resultados na diferenciação óssea, mas a proporção de 1:1 (ADMSC:Osteoblasto) obteve melhor resultado (ROZILA et al., 2016).

No âmbito da utilização de biomateriais, o titânio tem sido apresentado como fator influenciador da diferenciação óssea. Este material já é amplamente utilizado em implantes ósseos e dentários, onde já existem estudos relacionando as ligas de titânio e nanopartículas (DOMINGUEZ, 2012; HOU et al., 2013; SANTIAGO-MEDINA et al., 2015). As nanopartículas podem agir estimulando a diferenciação

penetrando ou não a membrana de forma que ativam vias de sinalização para transcrição de genes relacionadas a diferenciação óssea (PATIL e PAUL, 2014).

#### **1.4- Nanopartículas de Dióxido de Titânio (TiO<sub>2</sub>)**

A escala nanométrica é a unidade fundamental de comprimento sobre o qual células e moléculas interagem com os ambientes biológicos, a nanotecnologia então surgiu sob essa inspiração referindo-se a um novo conjunto de tecnologias que são usadas para desenvolver estruturas e dispositivos nessa nanoescala. Como exemplo podemos citar unidades básicas de proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos que apresentam propriedades singulares em nano escala (WANG et al., 2016). De acordo com a União Europeia em 2011, as estruturas consideradas em nano tem tipicamente as dimensões entre 1 e 100 nm, apresentando propriedades únicas ou aprimoradas e utilizadas em aplicações comerciais. Foram descritos como materiais manufaturados contendo partículas, num estado não ligado, agregado ou aglomerado. E dentro dessa diversidade de materiais se destacam as nanopartículas (NPs). As NPs já tem sido aplicadas para diversos fins, entre eles: materiais eletrônicos, cosméticos e protetores solares, para conferir ação antibacteriana em materiais e sistemas de *drug-delivery* (KISIN et al., 2007; ROBERTSON et al., 2010).

As nanopartículas de óxido metálico (NPs) podem ser compostas por uma variedade de materiais diversos, incluindo titânio, zinco, óxidos de cério, alumínio e ferro. Dentre eles o dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) têm sido estudado para uso na engenharia de tecidos devido à sua bioatividade e baixa citotoxicidade. Existem ainda muitas dúvidas quanto à sua citotoxicidade e genotoxicidade, fazendo-se necessário avaliações a esse respeito levando em consideração o grau de internalização nos organismos, nos tecidos e nas células, a indução de radicais livres, danos ao citoesqueleto, a capacidade de penetrar o núcleo celular e sua interação com o DNA (DE JONG e BORM, 2008; JOHNSTON et al., 2009).

O TiO<sub>2</sub> é fabricado mundialmente e muito utilizado para várias aplicações, como aditivo alimentar, em cosmético e pigmento para colorir. É encontrado em várias fases cristalinas, entre elas: a rutila, a anatase e a brookita. A fase rutila se apresenta como a mais termodinamicamente estável em altas temperaturas. Anatase e brookita são obtidas em temperaturas mais baixas, sendo que a forma

brookita é estável em condições específicas de pressão. Essas NPs vem se destacando na área médica, pois podem ter características únicas e, por vezes, novas propriedades, tais como a sua relação superfície/massa maior do que outras partículas, e a sua capacidade de adsorver e transportar outros compostos, como fármacos, sondas e proteínas (DE JONG e BORM, 2008; SYCHEVA et al., 2011).

. Uma nova perspectiva para a avaliação da biocompatibilidade de nanomateriais e regeneração tecidual surge ligando esses dois aspectos com a utilização de CTM-TAs. As propriedades da nanotecnologia associadas às características promissoras destas células, como a plasticidade, padrão de crescimento e imunomodulação, podem trazer diversos benefícios no âmbito da regeneração óssea.

## **1- Objetivos Gerais**

Avaliar a capacidade de diferenciação óssea de células-tronco mesenquimais isoladas de tecido adiposo associadas a nanopartículas de dióxido de titânio na fase cristalina composta por 64,56 % de rutila e 35,44 de anatase.

## **2- Objetivos Específicos**

- Isolamento e caracterização de células-tronco isoladas de material lipoaspirado;
- Quantificação da enzima fosfatase alcalina das CTM-TAs associadas ou não às NPs de TiO<sub>2</sub>;

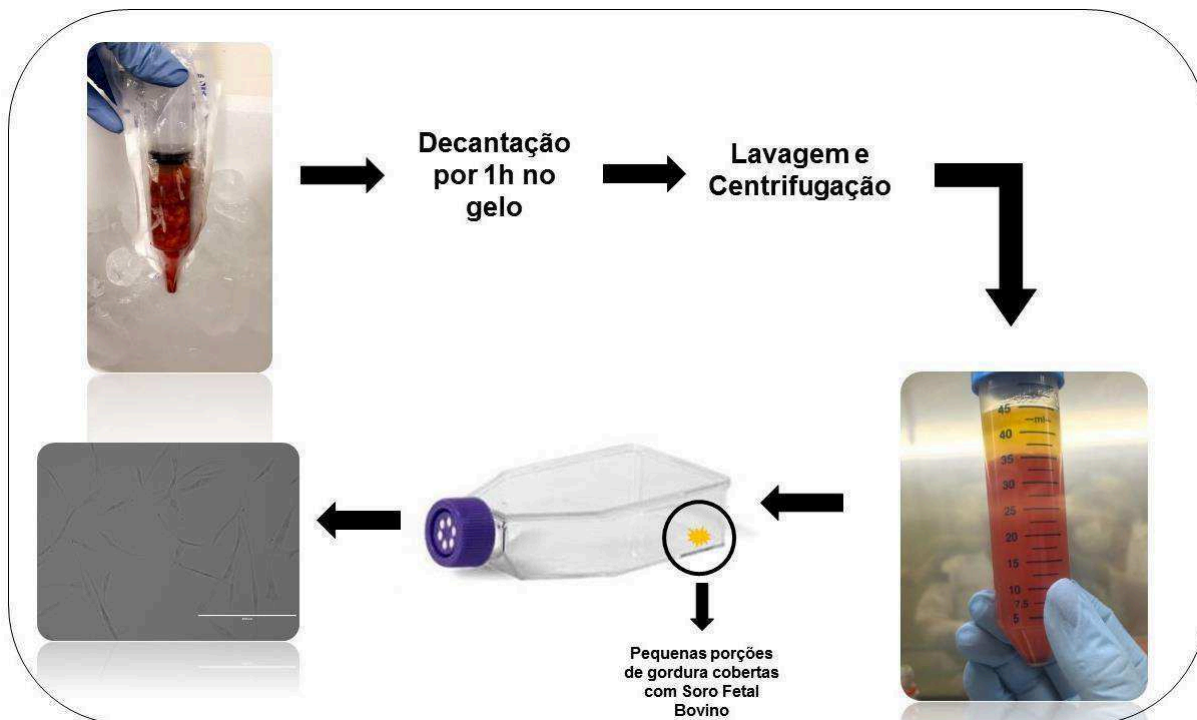
- Visualização e quantificação da mineralização óssea produzidas por células-tronco mesenquimais associadas ou não às NPs de TiO<sub>2</sub> através de coloração com Vermelho de Alizarina;

### **3- Material e Métodos**

#### **4.1- Isolamento e Caracterização das CTMs**

Foram coletadas amostras de tecido adiposo lipoaspirado, de acordo com aprovação do comitê de ética de CAAE:57965516.3.0000.51526 e parecer número: 1.776.680.

Após a assinatura do Termo de Consentimento livre e esclarecido foi recolhida amostras de tecido adiposo, da qual foram isoladas células-tronco mesenquimais pelo método não enzimático, utilizando o protocolo já otimizado no Laboratório de Nanobiotecnologia – UFU. No método não enzimático as seringas contendo material lipoaspirado passaram por um processo de decantação durante 1h, e após esse processo a porção de sangue foi descartada e parte do material foi lavado com Tampão Fosfato 1X (PBS 1X). Após lavagem com PBS pequenas porções do tecido adiposo foram semeadas em duas extremidades da garrafa de cultura de 25cm e cobertos com Soro Fetal Bovino (SFB). Após 24h foi adicionado meio de cultura Dulbecco Minimum Essential Media (DMEM) baixa glicose suplementado com 20% de SFB (Figura 1).



**Figura 1-** Esquematização do isolamento não-enzimático de CTM-TAs padronizado no Laboratório de Nanobiotecnologia- UFU.

A caracterização das células-tronco mesenquimais seguiu os critérios ditados pela *ISCT (International Society for Cellular Therapy)*. Considerando que foram utilizadas culturas de células de segunda a quinta passagem, tem-se que o primeiro critério, a adesão ao frasco de cultura, ditado pela *ISCT* foi contemplado. O segundo critério foi realizado por imunofenotipagem utilizando citometria de fluxo. Foram analisados os marcadores CD90 FITC (+), CD146 PE (-), CD184PE (-), CD45 PE (-).

Os experimentos foram realizados comparando 3 grupos:

- CTM-TAs cultivadas apenas com meio DMEM baixa glicose, como controle negativo;
- CTM-TAs cultivadas com meio DMEM baixa glicose suplementado com fatores osteogênicos (dexametasona, ácido ascórbico e  $\beta$ -Glicerofosfato);
- CTM-TAs cultivadas com DMEM baixa glicose suplementado com fatores osteogênicos e NPs de  $\text{TiO}_2$ , sintetizadas a temperatura de  $650^\circ\text{C}$  e na concentração de  $5\mu\text{g/ml}$ , durante 24 horas.

Os grupos foram avaliados após 7, 14 e 21 dias.

#### **4.2- Síntese e caracterização das Nanopartículas de dióxido de titânio**

As nanopartículas de TiO<sub>2</sub> foram fornecidas pelo Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia. As NPs de TiO<sub>2</sub> foram sintetizados por solução aquosa à temperatura ambiente. Primeiro uma solução 60ml de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>, 70%, Sigma Aldrich) em 300ml de água ultrapura e foi preparada sob agitação magnética. Então 60 ml de Isopropóxido de titânio (Ti (OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>4</sub>, 97%, Sigma-Aldrich) foi adicionado. O pH da solução foi ajustado para 5.6 utilizando solução de hidróxido de sódio 4 M (NaOH 98%, Sigma-Aldrich), a solução então foi completada com água para o volume de 400 ml com água ultrapura também sob agitação magnética por 30 minutos. A solução final foi mantida em descanso para possibilitar o processo de precipitação dos nanocristais de TiO<sub>2</sub>. O precipitado foi disperso em água ultra pura sob agitação magnética e centrifugado por 10 minutos a 6000rpm. Por fim o precipitado resultante purificado a partir desta solução foi submetido ao seguinte aquecimento sucessivo térmico: 100°C/24h, 500°C/1h, 650°C/1h e 800°C/1h.

Os padrões de difração de raios X (XRD) foram registrados com um XRD-6000 (Shimadzu) usando radiação monocromática Cu-K<sup>1</sup> ( $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ ), para confirmar a formação de nanocristais de TiO<sub>2</sub>, bem como a estrutura cristalina, média, tamanho e abundância relativa da fase anatase em rutila. O tamanho das NPs de TiO<sub>2</sub> foi estimado a partir da fórmula de Debye - Scherrer. Nos padrões XRD das amostras tratadas a 100° C / 24h e 500° C / 1h utilizou-se o pico de difração de Bragg (101) da fase anatase localizada em torno de  $2\theta = 25,4^\circ$ . Já nas amostras tratadas a 650° C / 1h e 800° C / 1h utilizou-se o pico (110) da fase de rutila localizada em torno de  $2\theta = 27,8^\circ$ . A fração em peso da anatase (WA), a fração ponderal da rutila (WR) e a fração ponderal de brookita (WB) foram calculadas com base em Zheng et al (BORIE, 1965; ZHANG e BANFIELD, 2000; YU et al., 2003).

#### **4.3- Quantificação da Enzima Fosfatase Alcalina (FA)**

A enzima FA foi quantificada através de kit Fosfatase Alcalina Labtest®. O kit parte do princípio que a enzima hidrolisa a timolftaléina monofosfato liberando timolftaléina, que apresenta cor azul em meio alcalino. A cor obtida no teste é



diretamente proporcional a atividade enzimática. As células foram submetidas a ação de Lauril Fosfato de sódio, detergente para lisar as células. Após a lise, as amostras foram misturadas ao reagente 1 e 2 do kit, que são timolftaleína monofosfato e um tampão, respectivamente, e estavam previamente aquecidos em banho-maria por 2 minutos à 37°C. Essa mistura ficou incubando também em banho-maria por 10 minutos. Após este tempo foi adicionado o reagente 3, que contém carbonato de sódio e hidróxido de sódio, que deixa o meio alcalino. As amostras então ficaram incubadas por 30 minutos. Após processamento as amostras foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 590nm. Em seguida, as amostras foram analisadas e quantificadas de acordo com as especificações do Fabricante nos tempos estabelecidos (7, 14 e 21 dias).

#### **4.4- Análise microscópica e quantificação da mineralização a partir da diferenciação osteogênica *in vitro***

Os três grupos de amostras de CTM-TAs nos três tempos (7, 14 e 21 dias) foram fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com o corante Vermelho de Alizarina. Os osteoblastos secretam uma matriz extracelular rica em cálcio, que pode ser corada com o corante Vermelho de Alizarina (Sigma Aldrich) e visualizada microscopicamente e macroscopicamente. Posteriormente, a análise foi realizada por microscopia (FS X100 Olympus) e a quantificação foi realizada utilizando solução de Cloreto de Cetilpiridínio em PBS 1x. As amostras ficaram incubadas com a solução por 15 minutos. Após esse tempo, 100 µl de cada amostra foram passadas para uma placa de 96 poços e suas absorbâncias foram lidas a 570nm (YANG et al., 2016).

#### **4.5- Análises Estatísticas**

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo Programa Prisma 5.0 utilizando o teste de One-way Anova, onde valores de 0,05% de probabilidade foram aceitos como estatisticamente significativos.

## 4- Resultados e Discussão

### 5.1- Isolamento e Caracterização das CTM-TAs

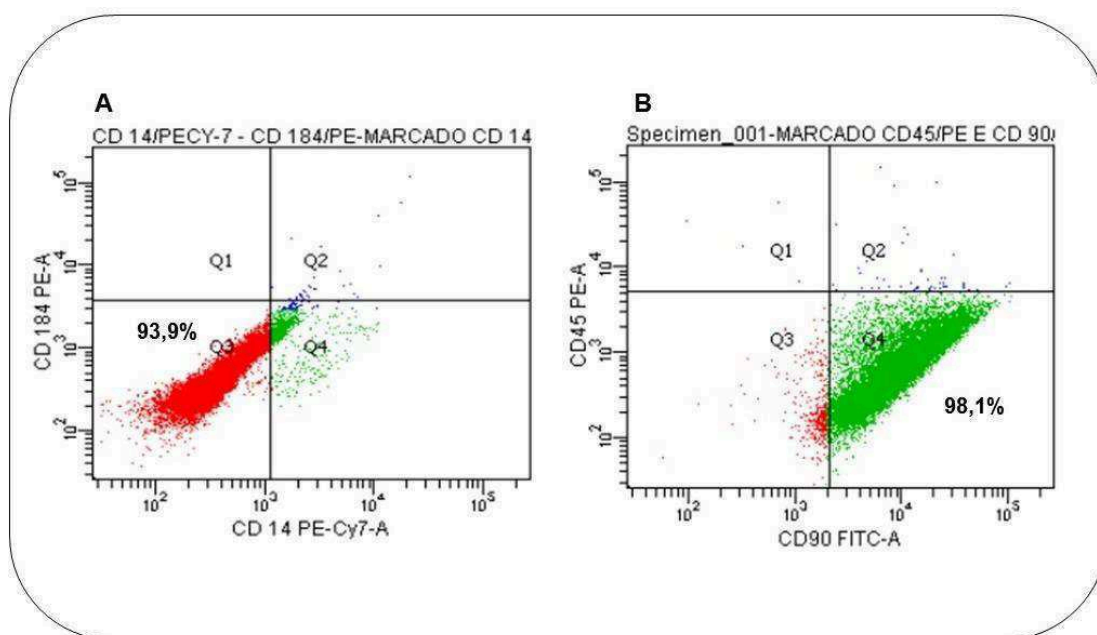
Após aproximadamente 15 dias de cultivo as células já começaram a colonizar o espaço da garrafa de cultura, e com 3 a 4 semanas já foi possível fazer repiques e expandir o número de células. A figura 2 mostra a morfologia das CTM-TAs utilizando microscopia óptica (Evos®), em terceira passagem, nos aumentos de 4x, 10x e 20x. As células apresentaram aspecto fibroblastóide e estavam aderidas à garrafa de cultura.



**Figura 2-** Células-tronco mesenquimais isoladas pela metodologia não-enzimática de tecido adiposo humano em terceira passagem. A: CTM-TAs no aumento 4X. B: CTM-TAs no aumento 10X. C: CTM-TAs no aumento 20X.

Após isolamento e expansão foi feita a caracterização das células por imunofenotipagem, onde foram analisados os marcadores CD90 (+), CD45 (-), CD184 (-) e CD14 (-) das células em terceira passagem (Figura 3). Como mostrado

na figura 3 a população isolada se mostrou 93,9% duplo negativa para CD184 e CD14, e 98,1% se mostrou positiva para CD90 e negativa para CD45. Assim, com os marcadores disponíveis foi confirmado o isolamento da população de CTM-TAs. Com os experimentos próximos que induziram diferenciação também foi possível caracterizar esta população celular. Desta forma, os critérios estabelecidos pelo INCT foram utilizados, onde foi confirmada aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, análise de quatro marcadores de superfície e capacidade de diferenciação (DOMINICI et al., 2006; P et al., 2011; GU et al., 2015)

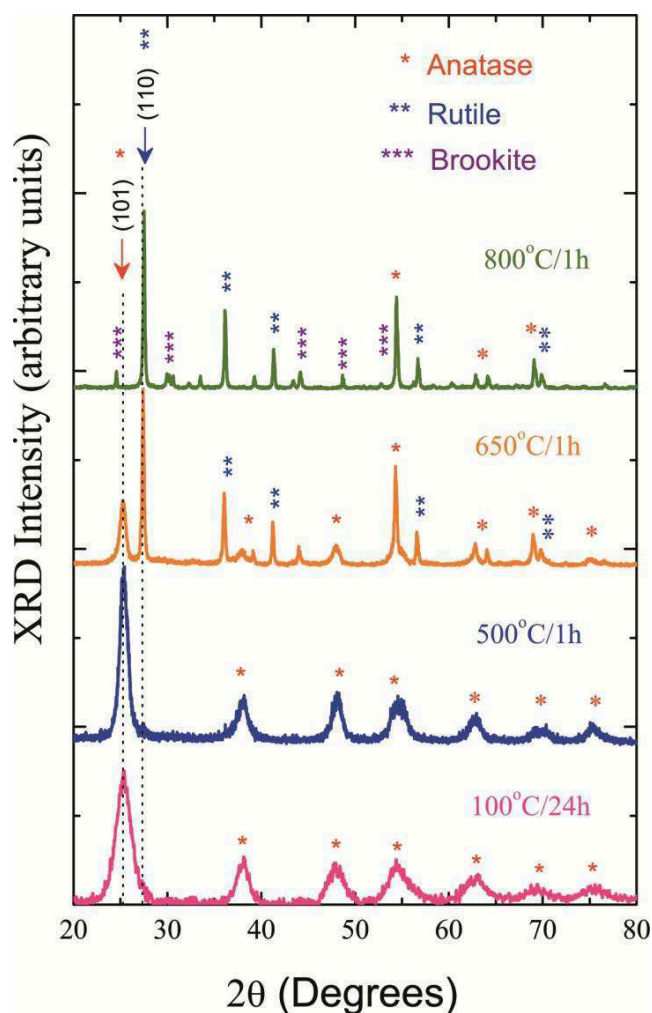


**Figura 3-** Análise por citometria de fluxo dos marcadores específicos de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano. A: CD14 E CD184, B: CD90, CD45.

## 5.2- Síntese e caracterização das Nanopartículas de dióxido de titânio

A Figura 4 mostra os padrões XRD das amostras que foram submetidas as temperaturas e tempos de 100°/24h, 500° C/1h, 650° C/1h e 800° C/1h. Os padrões das características da difração TiO<sub>2</sub> em anatase (JCPDS: 1: 21-1272), rutila (JCPDS: 1: 21-1276) e fase de brookita (JCPDS: 29-1360) foram representados pelos símbolos (\*), (\*\*) e (\*\*\*), respectivamente. Foi observado que à temperatura de 100° C somente observou-se a fase cristalina anatase. O aumento da temperature de 100° C para 500° C é um fator crucial para transformação da fase

de anatase para rutila, como mostrado na tabela 1, mas à temperatura de 650° C essa transformação é mais evidente. A presença de fase de brookita é frequentemente observada como subproduto quando a precipitação é realizada em um meio ácido (POTTIER et al., 2001; ABBAS et al., 2011). Com o aumento da temperatura para 800°C / 1h, observou-se que 16% da fração dos nanocristais eram de brookita.

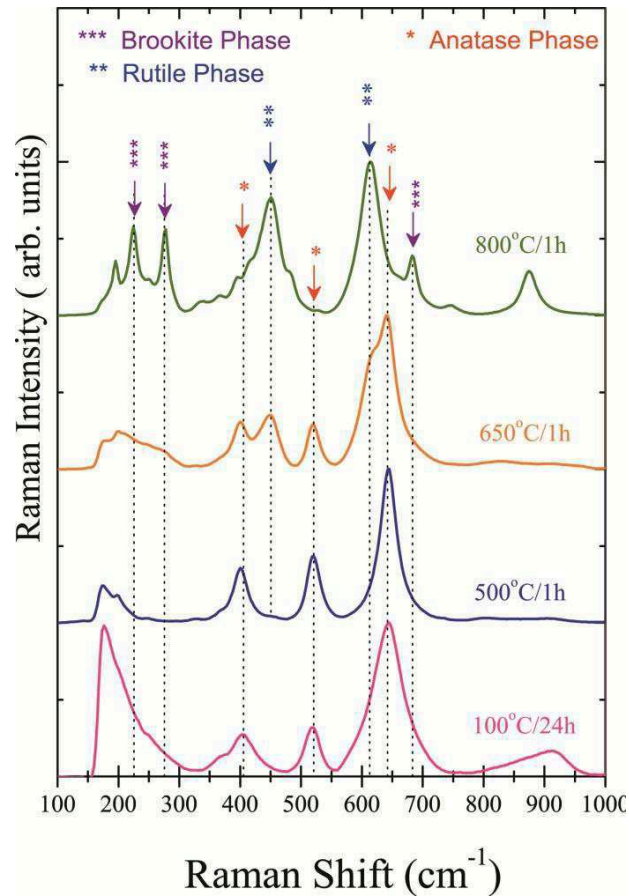


**Figura 4-** Padrões XRD das amostras sujeitas a técnicas de recozimento a 100°C / 24h, 500° C / 1h, 650° C / 1h e 800° C / 1h.

**Tabela 1-** Fração de tamanho e peso de anatase, fração ponderal de rutila e fração ponderal de brookita dos NC de TiO<sub>2</sub> submetidos a recozimento térmico a 100° C / 24h, 500°C / 1h, 650° C / 1h e 800° C / 1h.

Annealing Thermal	Size (nm)	Anatase (%)	Rutila (%)	Brookita (%)
100°C/24h	4.4	100,00	0	0
500°C/ 1h	8.5	91,06	8,94	0
650°C/ 1h	32	35,44	64,56	0
800°C/ 1h	44.1	0,00	84,07	15,93

A Figura 5 mostra os espectros de micro-Raman de NCO de TiO<sub>2</sub> sujeitos a aquecimento térmico de 100° C / 24h, 500° C / 1h, 650° C / 1h e 800° C / 1h. Todos os espectros foram normalizados até o pico de maior intensidade, de modo a facilitar a visualização dos modos ativos micro-Raman. Há bandas de Raman com vibrações características de nanocristais de TiO<sub>2</sub> de fase anatase para a amostra sob a temperatura de 100°C / 24h. O espectro Raman de um único cristal de anatase possui seis modos permitidos a 144 cm<sup>-1</sup> (Eg), 197 cm<sup>-1</sup> (Eg), 399 cm<sup>-1</sup> (B1g), 513 cm<sup>-1</sup> (A1g), 519 cm<sup>-1</sup> (B1g) e 639 cm<sup>-1</sup> (Temperature Dependence of the Raman Spectrum in Anatase TiO<sub>2</sub>, 1980; ZHANG et al., 2000).



**Figura 5-** Espectro Micro Raman de NCO de TiO<sub>2</sub> sujeitos a 100°C / 24h, 500°C / 1h, 650°C / 1h e 800°C / 1h.

A banda Raman em torno de 144 cm<sup>-1</sup> não foi visualizada porque o detector do sistema Raman usado para detectar foi da faixa de 150-1000 cm<sup>-1</sup>. Nos espectros de micro-Raman das amostras de com aquecimento térmico a 500°C / 1h, há também os modos vibracionais da fase anatase. No entanto, havia uma pequena banda em cerca de 450 cm<sup>-1</sup> associada a um modo vibracional de fase rutila. Com o aumento da temperatura térmica para 650°C / 1h ocorreu a transformação da fase de anatase em rutila e há algumas modificações no espectro de NC de TiO<sub>2</sub>. Essas mudanças estão relacionadas à transformação de anatase em fase de brookita, em excelente concordância com os resultados XRD (Figura 1). Nos espectros de NCT de TiO<sub>2</sub> sob a temperatura de 800 ° C / 1h existem modos de vibração da fase de brookita. Esses resultados confirmam a presença de fase de brookita, uma vez que a presença desta fase nos padrões XRD não está muito bem exibida. Portanto, baseados nos resultados de XRD e micro-Raman, pode-se

concluir que os NCO de TiO<sub>2</sub> são de alta pureza e exibem diferentes fases em função do tratamento térmico.

Muitos estudos se concentram na importância do tamanho de partícula de TiO<sub>2</sub> (e área de superfície) para a toxicidade das partículas (entre 21nm e 250nm), mas muito se tem discutido sobre a fase cristalina, química da superfície e foto atividade no potencial tóxico. Estudos principalmente em lesões pulmonares sugerem que partículas de tamanhos muito pequenos são responsáveis por maiores danos e citotoxicidade devido a sua grande área de superfície, além de que uma dose muito concentrada também influencia nos danos ao organismo (RENEWICK et al., 2004; JOHNSTON et al., 2009).

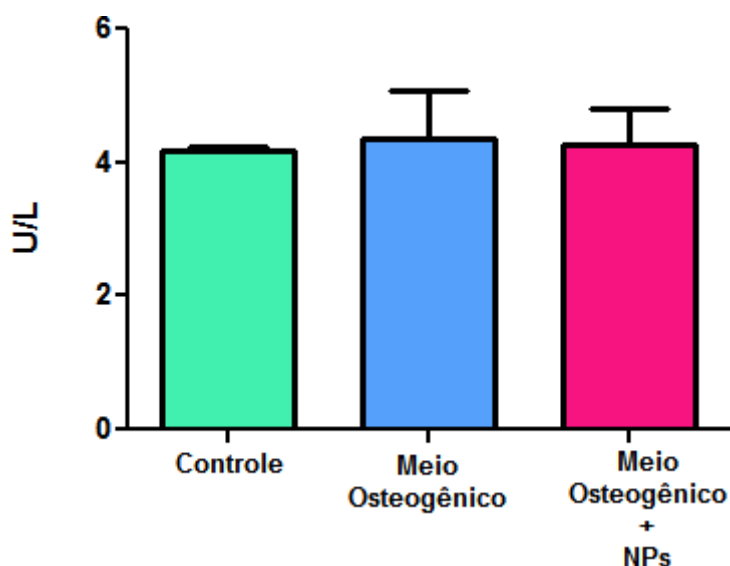
Da mesma maneira existem estudos que comparam as fases cristalinas quanto a citotoxicidade. TiO<sub>2</sub> é encontrada principalmente nas fases de anatase e rutila, e já existem resultados onde mostram que estas características estão relacionadas a diminuição da viabilidade celular. Estudos sugeriram que quanto maior o teor de anatase maior a capacidade de induzir morte celular (SIMON-DECKERS et al., 2008; JOHNSTON et al., 2009). Alguns pesquisadores já demonstraram também que a fase de anatase tem mais potencial para ocasionar danos no DNA do que a rutila em alguns tipos celulares, como fibroblasto, através da produção de ROS (DUNFORD et al., 1997; JOHNSTON et al., 2009). De acordo com a literatura e testes preliminares feitos pelo Grupo de Pesquisa em Células-Tronco, ainda não publicados, optou-se por usar neste trabalho as nanopartículas sintetizadas na temperatura de 650°C, que é constituída por uma mistura de anatase e rutila, mas com maior parte da segunda fase (64,56%), apresentando tamanho médio de 32nm.

### **5.3- Quantificação da Enzima Fosfatase Alcalina (FA)**

FA é considerada um marcador inicial para diferenciação osteogênica. Juntamente com a osteopontina e a osteocalcina é responsável por dar suporte a formação de nódulos ósseos, que participam da mineralização da matriz no processo de osteogênese (YANG et al., 2016).

Após 7 dias da indução osteogênica de células-tronco mesenquimais, observou-se que os três grupos (CTM-TAs sem meio osteogênico, CTM-TAs com meio

osteogênico e CTM-TAs com meio osteogênico associadas a NPs) apresentaram quantidades da enzima semelhantes (Figura 6). Esse comportamento era esperado visto que aos 7 dias as células, independente do meio que estão sendo cultivadas, estão em fase de proliferação (PATIL e PAUL, 2014). Fase esta que não se espera diferenciação nas células, mesmo quando estimuladas com os fatores osteogênicos ou com as NPs. Desta forma a presença da enzima se mantém em baixa quantidade sugerindo um comportamento basal, não havendo diferença estatística entre elas, ou seja, os grupos estimulados apresentaram comportamento igual as células cultivadas apenas com DMEM baixa glicose (Controle negativo) (Figura 6). Este mesmo comportamento neste intervalo de tempo foi observado por Li e colaboradores (2017), que ao observar superfícies de titânio modificadas com *nanorod*s de Ti observaram que na fase inicial não há aumento na quantificação da enzima FA (LI et al., 2017).



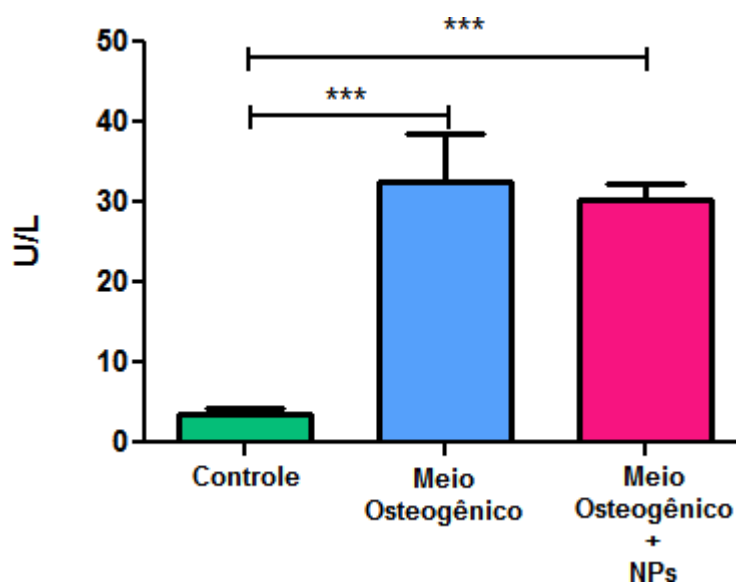
**Figura 6-** Quantificação da Enzima Fosfatase Alcalina em Unidades por litro após 7 dias do tratamento das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano.

Uma das principais funções fisiológicas da FA no organismo é a hidrólise de ésteres de fosfato no processo de osteogênese, fornecendo os grupos de fosfato necessários para a deposição de hidroxiapatita. De maneira geral é esperado um



aumento da atividade de FA durante o avanço do estágio inicial da diferenciação osteogênica (PATIL e PAUL, 2014; SHARMA et al., 2014).

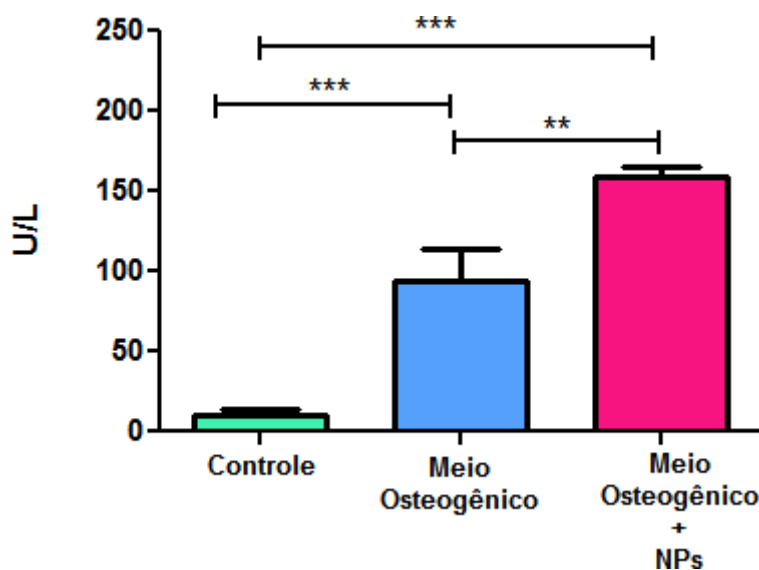
Aos 14 dias após o tratamento foi observado um aumento significativo na quantificação da enzima FA para o grupo de CTM-TAs cultivadas com DMEM osteogênico e para o grupo cultivado com NPs, quando comparado com o controle negativo, o que pode ser constatado na figura 7. O controle negativo continuou apresentando quantificação baixa de FA, como ocorreu aos 7 dias após o tratamento. Os grupos tratados apresentaram aumento na quantificação de forma homogênea entre si, não havendo diferenças estatísticas entre eles. Hou e colaboradores (2013), ao fazer testes com NPs de dióxido de titânio também observaram aumento da FA depois de 14 dias de cultura das células. Foram testadas NPs nos tamanhos 14 nm, 108 nm, e 196 nm, sendo que os dois primeiros tamanhos apresentaram este aumento. Li e colaboradores (2017), nos experimentos com *nanorods* acima citados também observaram aumento da FA aos 14 dias (LI et al., 2017).



**Figura 7** - Quantificação da Enzima Fosfatase Alcalina em Unidades por litro após 14 dias do tratamento das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano.

Após 21 dias de tratamentos das CTM-TAs com NPs, a quantidade de FA continuou aumentando para os grupos cultivados com DMEM osteogênico com e

sem a presença Nanopartículas. O aumento foi significativo em relação a quantificação basal observada no controle negativo. E entre os dois grupos tratados houve significância estatística, o que sugere que as nanopartículas influenciaram neste aumento da quantificação da enzima no ensaio com 21 dias, e tiveram efeito positivo na diferenciação óssea de CTM-TAs (Figura 8).



**Figura 8** - Quantificação da Enzima Fosfatase Alcalina em Unidades por litro após 21 dias do tratamento das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano.

Tais testes confirmam que a quantificação da fosfatase alcalina é um importante marcador osteogênico no estágio de diferenciação de osteogênese no Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais (ZHU et al., 2013).

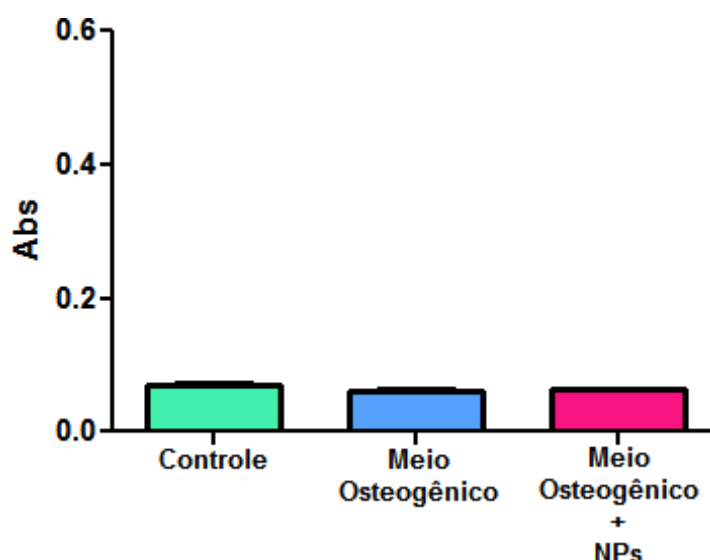
#### **5.4- Quantificação e Análise da mineralização a partir da diferenciação osteogênica *in vitro***

O processo de diferenciação óssea e formação do osso é um processo bem organizado e lento, está associado a alterações nos padrões de expressão gênica através de 3 estágios de desenvolvimento: (i) proliferação, (ii) produção e maturação da matriz extracelular e (iii) mineralização da matriz (BIRMINGHAM, 2012; PATIL e PAUL, 2014). No primeiro estágio há um pico de crescimento celular que vai do primeiro dia até aproximadamente do quarto ao sétimo. O segundo estágio é o começo da diferenciação osteogênica precoce que vai até aproximadamente o décimo quarto dia, com aumento da expressão de fosfatase

alcalina, e onde se observa também o começo do depósito da matriz colágena sobre a qual o material mineralizado é depositado. O último estágio ocorre do décimo quinto até aproximadamente o vigésimo oitavo dia, onde ocorre alta expressão de osteocalcina e osteopontina, seguida de deposição de cálcio e fosfato (QUARLES et al., 1992; HUANG et al., 2007; HOEMANN et al., 2009; BIRMINGHAM, 2012)

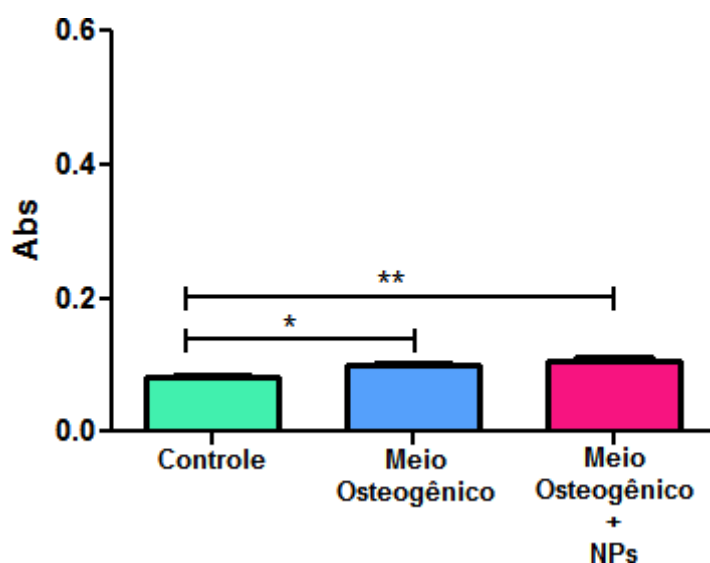
O meio osteogênico possui uma fonte rica de fosfato, ácido ascórbico e dexametasona que são disponibilizados às células, que juntamente com o  $\text{Ca}^{2+}$  vão formar a hidroxiapatita, que é o principal componente inorgânico do osso (ANDERSON, 1969; GREGORY et al., 2004). A Quantificação e análise da mineralização a partir da diferenciação osteogênica foi verificada utilizando o corante vermelho de Alizarina que é adsorvido justamente no  $\text{Ca}^{2+}$  da hidroxiapatita (MORIGUCHI et al., 2003).

A quantificação feita da mineralização mostrou que aos 7 dias em nenhum dos três grupos havia a presença significativa do corante vermelho de Alizarina, não havendo inclusive diferença estatística significativa entre os grupos. Mostrando outra que vez, que neste tempo ocorre a fase de proliferação celular e não de diferenciação (BIRMINGHAM, 2012; PATIL e PAUL, 2014).



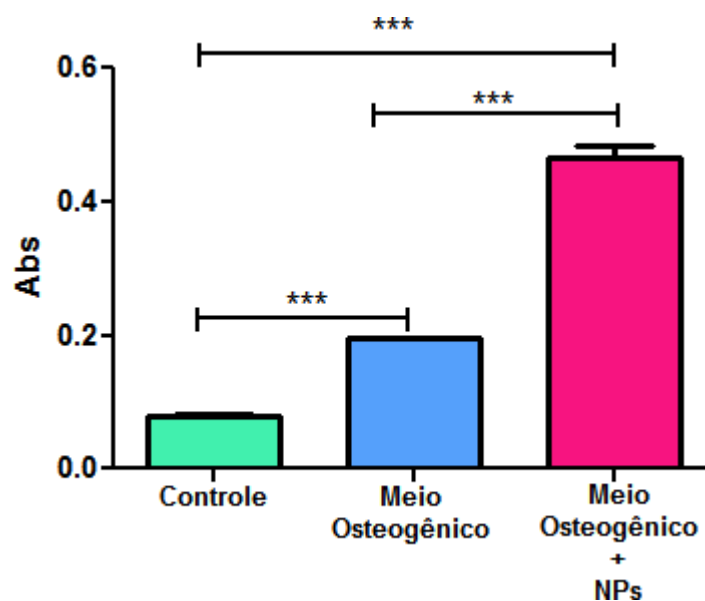
**Figura 9-** Quantificação da mineralização da matriz celular utilizando o corante Vermelho de Alizarina após 07 dias do tratamento das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano

Aos 14 dias observou-se um aumento na quantidade de Vermelho de Alizarina nos grupos cultivados com Meio Osteogênico e Meio Osteogênico com NPs em relação ao controle negativo, que continua a apresentar uma quantificação muito baixa (Figura 10). Nesta fase já é possível observar o começo do processo de diferenciação nos grupos tratados, que apresentaram um aumento da mineralização em relação ao controle negativo, mas não se mostraram diferentes entre si.



**Figura 10** – Quantificação da mineralização da matriz celular utilizando o corante Vermelho de Alizarina após 14 dias de tratamento das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano.

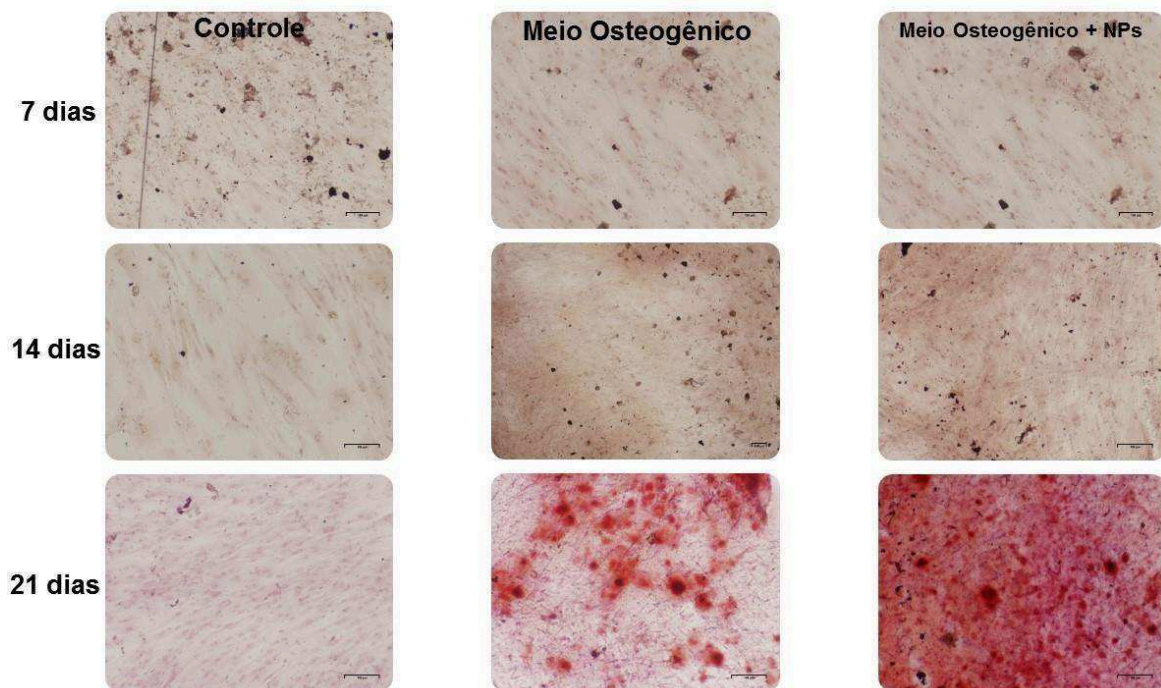
A quantificação feita com 21 dias de cultura de CTM-TAs após o tratamento com NPs mostrou características da fase de diferenciação plenamente estabelecida. Os grupos tratados apresentaram quantificação do corante vermelho de alizarina bem maior em relação ao controle, validando os resultados obtidos na quantificação de FA. O grupo cultivado com meio osteogênico e NPs apresentou maior quantidade do corante vermelho de alizarina em relação as células tratadas apenas com meio osteogênico (Figura 11).



**Figura 11-** Quantificação da mineralização da matriz celular utilizando o corante Vermelho de Alizarina após 21 dias de tratamento das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano.

Experimentos feitos com NPs de prata também apresentaram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho com NPs de  $\text{TiO}_2$ . Aos 21 dias a quantificação de vermelho de alizarina aumentou após a utilização de cloreto de cetilpiridínio, mostrando assim aumento da área mineralizada em CTM-TAs (SENGSTOCK et al., 2014).

As análises realizadas por microscopia ótica corroboraram com os resultados obtidos na quantificação do vermelho de alizarina por absorvância. Observou-se que aos 7 dias não houve indícios do corante vermelho de alizarina em nenhum dos três grupos. Aos 14 dias já se pode observar alguma adsorção do corante devido ao início do depósito da matriz óssea. Já aos 21 dias é possível observar com clareza que os grupos cultivados com Meio Osteogênico e Meio Osteogênico com NPs apresentaram áreas importantes coradas em vermelho, sendo observado que no meio osteogênico existem muitos focos de mineralização, mas no grupo com as NPs a área mineralizada apresentou-se bem maior, não sendo possível observar focos isolados (Figura 12).



**Figura 12** – Registros de Microscopia óptica das células cultivadas com DMEM baixa glicose (controle), DMEM Osteogênico e DMEM Osteogênico com nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  (aumento 10X).

Assim no presente trabalho os resultados referentes a quantificação de FA obtidos após tratamento das CTM-TAs com NPs validam os resultados obtidos nos experimentos de quantificação da mineralização celular, o que sugere que o aumento de FA com o uso de NPs influencia no aumento do fornecimento de grupos fosfato para a formação de hidroxiapatita, e esta aumenta sua participação no processo de mineralização celular, o que foi confirmado nos resultados obtidos com CTM-TAs com NPs.

## 5- Conclusão

Os resultados deste trabalho sugerem que as NPs de  $\text{TiO}_2$ , sintetizadas a temperatura de  $650^\circ\text{C}$  que apresentam composição de 64,56 % de rutila e 35,44 de anatase, são capazes de influenciar positivamente a diferenciação óssea de CTM-TAs.

## Perspectivas Futuras

Ensaio para análise de expressão de genes relacionados ao processo de diferenciação óssea, como Osteopontina e Osteocalcina, bem como outros ensaios que remetem as mudanças e transformações sofridas pelas CTM-TAs ao passarem para os estágios de osteócitos e osteoblastos.

## 6- Referências

ABBAS, Z. et al. Synthesis, characterization and particle size distribution of TiO<sub>2</sub> colloidal nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 384, n. 1, 2011/07/05/, p. 254-261. 2011.

ALVES A., M. A. R. **Simples assim: células-tronco**: Editora Atheneu, v. 2014. 143 p.

ANDERSON, H. C. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. **J Cell Biol**, v. 41, n. 1, Apr, p. 59-72. 1969.

BARRY, F. P. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v. 69, n. 3, Aug, p. 250-6. 2003.

BIRMINGHAM, E., NIEBUR, G. L., MCHUGH, P. E., ET AL. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. **European Cells and Materials**, v. 23, n., p. 13-27. 2012. <https://doi.org/10.22203/eCM.v023a02>

BJORN BEHR, S. H. K., VICTOR W. WONG, GEOFFREY C. GURTNER, MICHAEL T. LONGAKER. Stem cells. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 26, n. 4, p. 2010.

BORIE, B. X-Ray Diffraction in Crystals, Imperfect Crystals, and Amorphous Bodies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, n. 1, 1965/01/01, p. 140-141. 1965.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. LEI Nº 11.105, DE 24 DE MARÇO DE 2005. Brasília. Lei de Biossegurança. Disponível em <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2005/lei/111105.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/111105.htm)>. 2017.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641-650. 1991.

CHOI, S. Y. et al. Gold nanoparticles promote osteogenic differentiation in human adipose-derived mesenchymal stem cells through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, n., 07/07, p. 4383-4392. 2015.

DE JONG, W. H. e BORM, P. J. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. **Int J Nanomedicine**, v. 3, n. 2, p. 133-49. 2008. <https://doi.org/10.2147/IJN.S596>



DOMINGUEZ, C. O. A. A. Titanium as a Biomaterial for Implants, Recent Advances in Arthroplasty, DOI: 10.5772/27413. Available from: <https://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-arthroplasty/titanium-as-a-biomaterial-for-implants>. **Dr. Samo Fokter (Ed.), InTech**, v., n., p. 2012. <https://doi.org/10.5772/27413>

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7. 2006. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>

DUNFORD, R. et al. Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. **FEBS Lett**, v. 418, n. 1-2, Nov 24, p. 87-90. 1997.

EVANS, M. Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 10, 10/print, p. 680-686. 2011.

FRIEDENSTEIN, A. J. et al. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp Hematol**, v. 4, n. 5, Sep, p. 267-74. 1976.

FUKUCHI, Y. et al. Human Placenta-Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential. **STEM CELLS**, v. 22, n. 5, p. 649-658. 2004.

GAGE, F. H. Mammalian Neural Stem Cells. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1433. 2000.

GREGORY, C. A. et al. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Anal Biochem**, v. 329, n. 1, Jun 01, p. 77-84. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.02.002>

GU, H. et al. Role of c-Jun N-terminal kinase in the osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. **Exp Cell Res**, v. 339, n. 1, Nov 15, p. 112-21. 2015.

HEO, J. S. et al. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. **Int J Mol Med**, v. 37, n. 1, Jan, p. 115-25. 2016.

HERMIDA-GOMEZ, T. et al. Quantification of cells expressing mesenchymal stem cell markers in healthy and osteoarthritic synovial membranes. **J Rheumatol**, v. 38, n. 2, Feb, p. 339-49. 2011.

HOEMANN, C. D. et al. In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. **Pathologie Biologie**, v. 57, n. 4, 2009/06/01/, p. 318-323. 2009. <https://doi.org/10.1083/jcb.41.1.59>

HOU, Y. et al. Effects of titanium nanoparticles on adhesion, migration, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, n., 09/23, p. 3619-3630. 2013.



- HUANG, Z. et al. The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors [correction of osteoprogenitors] to osteoblasts in vitro. **Tissue Eng**, v. 13, n. 9, Sep, p. 2311-20. 2007. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0423>
- JAENISCH, R. e YOUNG, R. Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 567-582.
- JOHNSTON, H. J. et al. Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO<sub>2</sub> particulates: the contribution of physicochemical characteristics. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 6, n., 12/17 08/17/received 12/17/accepted, p. 33-33. 2009.
- KISIN, E. R. et al. Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. **J Toxicol Environ Health A**, v. 70, n. 24, Dec, p. 2071-9. 2007.
- LENDECKEL, S. et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 32, n. 6, 2004/12/01/, p. 370-373. 2004.
- LI, Z. et al. TiO<sub>2</sub> nanorod arrays modified Ti substrates promote the adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 76, n., Jul 01, p. 684-691. 2017.
- LONG, M. W. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. **Blood Cells Mol Dis**, v. 27, n. 3, May-Jun, p. 677-90. 2001.
- MA, S. et al. Immunobiology of mesenchymal stem cells. **Cell Death Differ**, v. 21, n. 2, 02//print, p. 216-225. 2014.
- MARKARIAN, C. F. et al. Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 4, p. 693-702. 2014.
- MORAES, A. M., AUGUSTO, E. F. P., CASTILHO, L.R. **Tecnologia do Cultivo de animais: de biofármacos à terapia genética**. São Paulo: Editora ROCA, v. 2008
- MORIGUCHI, T. et al. Elucidation of adsorption mechanism of bone-staining agent alizarin red S on hydroxyapatite by FT-IR microspectroscopy. **J Colloid Interface Sci**, v. 260, n. 1, Apr 01, p. 19-25. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(02\)00157-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(02)00157-1)
- MORRISON, S. J. et al. Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology. **Cell**, v. 88, n. 3, 1997/02/07, p. 287-298. 1997.
- P, M. et al. Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization - a systematic review of the literature. **Open Orthop J**, v. 5, n. Suppl 2, p. 253-60. 2011.
- PARK, J. C. et al. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. **J Clin Periodontol**, v. 38, n. 8, Aug, p. 721-31. 2011.

PATIL, S. e PAUL, S. A Comprehensive Review on the Role of Various Materials in the Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells with a Special Focus on the Association of Heat Shock Proteins and Nanoparticles. **Cells Tissues Organs**, v. 199, n. 2-3, p. 81-102. 2014. <https://doi.org/10.1159/000362226>

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147. 1999.

POTTIER, A. et al. Synthesis of brookite TiO nanoparticles by thermolysis of TiCl in strongly acidic aqueous media. **Journal of Materials Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 1116-1121. 2001.

QUARLES, L. D. et al. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 7, n. 6, p. 683-692. 1992. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650070613>

RENWICK, L. C. et al. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. **Occup Environ Med**, v. 61, n. 5, May, p. 442-7. 2004.

REVEL, A. Multitasking human endometrium: a review of endometrial biopsy as a diagnostic tool, therapeutic applications, and a source of adult stem cells. **Obstet Gynecol Surv**, v. 64, n. 4, Apr, p. 249-57. 2009. <https://doi.org/10.1097/OGX.0b013e318195136f>

ROBERTSON, T. A. et al. Are Commercially Available Nanoparticles Safe When Applied to the Skin? **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, n. 5, //, p. 452-468. 2010.

ROBEY, P. G. Series Introduction: Stem cells near the century mark. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 11, 06/01/, p. 1489-1491. 2000.

ROMAGNOLI, C. e BRANDI, M. L. Adipose mesenchymal stem cells in the field of bone tissue engineering. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 2, 04/26 11/19/received 12/19/revised 03/03/accepted, p. 144-152. 2014.

ROZILA, I. et al. Differential osteogenic potential of human adipose-derived stem cells co-cultured with human osteoblasts on polymeric microfiber scaffolds. **J Biomed Mater Res A**, v. 104, n. 2, Feb, p. 377-87. 2016.

SAKAGUCHI, Y. et al. Suspended cells from trabecular bone by collagenase digestion become virtually identical to mesenchymal stem cells obtained from marrow aspirates. **Blood**, v. 104, n. 9, p. 2728. 2004.

SÁNDOR, G. K. et al. Adipose Stem Cell Tissue–Engineered Construct Used to Treat Large Anterior Mandibular Defect: A Case Report and Review of the Clinical Application of Good Manufacturing Practice–Level Adipose Stem Cells for Bone Regeneration. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 71, n. 5, 2013/05/01/, p. 938-950. 2013.

- SANTIAGO-MEDINA, P. et al. Titanium Oxide: A Bioactive Factor in Osteoblast Differentiation. **International Journal of Dentistry**, v. 2015, n., 11/18 08/12/received 10/19/revised 10/27/accepted, p. 357653. 2015.
- SCHWAB, K. E. et al. Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells. **Hum Reprod**, v. 23, n. 4, Apr, p. 934-43. 2008.
- SEITA, J. e WEISSMAN, I. L. Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation. **Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine**, v. 2, n. 6, Nov-Dec, p. 640-653. 2010.
- SENGSTOCK, C. et al. Effect of silver nanoparticles on human mesenchymal stem cell differentiation. **Beilstein J Nanotechnol**, v. 5, n., p. 2058-69. 2014. <https://doi.org/10.3762/bjnano.5.214>
- SHARMA, U. et al. Alkaline phosphatase: an overview. **Indian J Clin Biochem**, v. 29, n. 3, Jul, p. 269-78. 2014.
- SIMON-DECKERS, A. et al. In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. **Toxicology**, v. 253, n. 1-3, Nov 20, p. 137-46. 2008.
- SOBHANI, A. et al. Multipotent Stem Cell and Current Application. **2017**, v., n., 2017-02-05, p. 18. 2017.
- SYCHEVA, L. P. et al. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice in vivo. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 726, n. 1, 11/27/, p. 8-14. 2011.
- Temperature Dependence of the Raman Spectrum in Anatase TiO<sub>2</sub>. **Journal of the Physical Society of Japan**, v. 48, n. 5, 1980/05/15, p. 1661-1668. 1980.
- TILL, J. E. e MCCULLOCH, E. A. Hemopoietic stem cell differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 605, n. 4, 1980/11/26, p. 431-459. 1980.
- Types of Stem Cells. <http://www.closerlookatstemcells.org/learn-about-stem-cells/types-of-stem-cells>. 2015 2015.
- ULLAH, I. et al. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. **Bioscience Reports**, v. 35, n. 2, 04/28 01/29/received 03/10/revised 03/20/accepted, p. e00191. 2015.
- VERÔNICA FERREIRA DE SOUZA, L. M. D. C. L., SILVIA REGINA DE ALMEIDA REIS, LUCIANA MARIA PEDREIRA RAMALHO, JEAN NUNES SANTOS. Células-tronco: uma breve revisão. **R. Ci. méd. biol**, v. 2, n. 2, p. 251-256. 2003.
- WANG, J. et al. Adverse Biological Effect of TiO<sub>2</sub> and Hydroxyapatite Nanoparticles Used in Bone Repair and Replacement. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, 05/24 04/08/received 05/19/accepted, p. 798. 2016.

- WEISSMAN, I. L. Stem Cells. **Cell**, v. 100, n. 1, 2000/01/07, p. 157-168. 2000.
- WILSON, K. D. e WU, J. C. Induced pluripotent stem cells. **JAMA**, v. 313, n. 16, p. 1613-1614. 2015.
- YANG, J. et al. Regulation of the secretion of immunoregulatory factors of mesenchymal stem cells (MSCs) by collagen-based scaffolds during chondrogenesis. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 70, n. Pt 2, Jan 01, p. 983-991. 2017.
- YANG, X. et al. The stimulatory effect of silica nanoparticles on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Biomed Mater**, v. 12, n. 1, Dec 02, p. 015001. 2016. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/12/1/015001>
- YI, H. et al. Recent advances in nano scaffolds for bone repair. **Bone Research**, v. 4, n., 12/13 06/28/received 09/19/revised 09/30/accepted, p. 16050. 2016.
- YU, J.-G. et al. The Effect of Calcination Temperature on the Surface Microstructure and Photocatalytic Activity of TiO<sub>2</sub> Thin Films Prepared by Liquid Phase Deposition. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 50, 2003/12/01, p. 13871-13879. 2003.
- YU, J. et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1917-1920. 2007.
- ZAGO M. A., C. D. T. **Células-Tronco, a nova fronteira da medicina**, v. 1. 2006
- ZHANG, H. e BANFIELD, J. F. Understanding Polymorphic Phase Transformation Behavior during Growth of Nanocrystalline Aggregates: Insights from TiO<sub>2</sub>. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 15, 2000/04/01, p. 3481-3487. 2000.
- ZHANG, H. et al. The existence of epithelial-to-mesenchymal cells with the ability to support hematopoiesis in human fetal liver. **Cell Biol Int**, v. 29, n. 3, Mar, p. 213-9. 2005.
- ZHANG, W. F. et al. Raman scattering study on anatase TiO<sub>2</sub> nanocrystals. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 33, n. 8, p. 912. 2000.
- ZHENG, C. et al. Human multipotent mesenchymal stromal cells from fetal lung expressing pluripotent markers and differentiating into cell types of three germ layers. v., n. 1555-3892 (Electronic), 20100127 DCOM- 20100413, p.
- ZHU, H. et al. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. **Nat Protoc**, v. 5, n. 3, Mar, p. 550-60. 2010.
- ZHU, Y. et al. Control over the gradient differentiation of rat BMSCs on a PCL membrane with surface-immobilized alendronate gradient. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 2, Feb 11, p. 342-9. 2013. <https://doi.org/10.1021/bm301523p>
- ZUK, P. A. et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 12, December 1, 2002, p. 4279-4295. 2002.