

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE
TECIDO ADIPOSEO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO**

Yasmim Twanne de Cássia Silva

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas

UBERLÂNDIA - MG
Junho/2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE
TECIDO ADIPOSEO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO**

Yasmim Twanne de Cássia Silva

Profa. Dra. Vivian Alonso Goulart

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas

UBERLÂNDIA - MG
Junho/2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE
TECIDO ADIPOSEO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO**

Yasmim Twanne de Cássia Silva

Profa. Dra. Vivian Alonso Goulart
Instituto de Genética e Bioquímica – INGEB

Homologado pela coordenação do Curso
de Ciências Biológicas em __/__/__

Prof. Dr. Oswaldo Marçal Júnior

UBERLÂNDIA - MG
Junho/2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE
TECIDO ADIPOSEO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO**

Yasmim Twanne de Cássia Silva

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de

AGRADECIMENTOS

Primeiramente venho agradecer a **Deus** por ser meu guia, meu conforto, meu refúgio e minha força em todos os bons e maus momentos vividos durante esses cinco anos de graduação. Sem Ele essa vitória não seria possível.

Aos meus pais, **Cleuzamar e Vicente**, que me apoiaram desde a escolha do curso até aqueles sábados e domingos que deixei de estar com eles para estar na universidade fazendo experimentos ou estudando. Obrigada por compreender aqueles momentos de estresse e de cansaço vividos em muitos momentos e por compartilhar comigo todas as alegrias da minha caminhada. Vocês são minha força e meu incentivo para nunca desistir dos meus sonhos. Essa vitória também é de vocês!

À minhas irmãs, **Bárbara, Karoline e Vanessa**, que estiveram ao meu lado em todos os momentos, me ajudando e incentivando a cada escolha. Obrigada por serem parte da minha vida e por serem a minha base. Também aos meus cunhados **Ronaldo e Ronan** por todo apoio e auxílio.

Aos meus surubentos do coração, amigos de longa data, **Francesco, Kenepher, Luigi, Mariana e Moara**, que caminham comigo desde os tempos em que ainda nem sabíamos o que queríamos ser quando crescêssemos. Vocês foram essenciais em cada detalhe! Obrigada por cada choro compartilhado, pela parceria nas festanças da vida, pelos churrascos memoráveis e por cada gargalhada nas conversas mais sem pé nem cabeça que temos com frequência. Com vocês construí uma segunda família, obrigada!

Aqueles que construí mais que uma amizade, meus companheiros, meus cúmplices. **Diana, Duda, Karoline, Natália, Max, Maria e Tiago**, que compartilharam comigo todos os altos e baixos momentos da faculdade. Desde os almoços no R.U, cafés da tarde, eventos familiares na casa dos outros, viagens, festas e bares até os estudos em grupo durante a

madrugada, as decepções por algumas notas, os choros de saudades e as tardes com trabalhos infinitos e estressantes. Com vocês cheguei neste momento tão importante. Obrigada, Amis!

Aos meus amigos biotecnologistas **Jessica, Lander e Lorena**, que surgiram em minha caminhada da maneira mais inesperada, mas que a tornaram mais importante com suas presenças. Obrigada pelo carinho, apoio e pelas boas risadas compartilhadas.

A professora **Vivian Alonso Goulart** que me acolheu e me ensinou muito do que sei hoje. Obrigada por me orientar neste projeto de pesquisa e por toda paciência ao longo do caminho.

Àquelas que fizeram da minha rotina de laboratório mais divertida e agitada. **Isabela e Cristiane**, obrigada por me ajudarem em cada experimento, pela companhia nos finais de semana no laboratório e por cada risada dada dentro da sala de cultura, que não foram poucas. Vocês me ensinaram muito!

Ao **Laboratório de Nanobiotecnologia** que me deu a oportunidade e todo o suporte para desenvolver minha pesquisa.

RESUMO

As células-tronco mesenquimais são células indiferenciadas, que se autorenovam e tem capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares como adipócitos, condrócitos e linhagens de osteoblastos. As células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM-TAs) tem bom rendimento e são de fácil acesso, o que as tornam viáveis para a engenharia de tecidos e medicina regenerativa. O uso de nanomateriais também tem apresentado bons resultados para estas aplicações, permitindo um melhor crescimento e reparação de tecidos ou ossos do corpo humano. A utilização de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) em conjunto com células-tronco apresentam um grande avanço na terapia celular, possibilitando procedimentos mais eficientes e rápidos. Este trabalho teve como objetivo analisar a capacidade de proliferação e viabilidade celular das CTM-TAs quando submetidas a quatro concentrações e temperaturas de síntese distintas de nanopartículas de TiO_2 . As CTM-TAs foram isoladas de material lipoaspirado (CEP n. 336.126) e caracterizadas por citometria de fluxo. Realizou-se um ensaio de MTT para análise de viabilidade celular das CTM-TAs frente as concentrações 5, 50, 100 e 250 μg de nanopartículas de TiO_2 , sintetizadas nas temperaturas de 100, 500, 650 e 800°C. Para avaliar a proliferação celular foi feito o ensaio de Unidade Formadora de Colônia (UFC) onde as CTM-TAs também foram submetidas as mesmas concentrações e temperaturas de sínteses das nanopartículas de TiO_2 que o teste anterior. A viabilidade e proliferação das CTM-TAs não apresentou alteração nas concentrações de 5 e 50 μg de TiO_2 quando comparadas ao controle negativo, mas utilizando 100 e 250 μg de TiO_2 houve uma redução na viabilidade e proliferação celular estatisticamente significativa. Portanto é possível concluir que as nanopartículas de TiO_2 em conjunto com as CTM-TAs nas concentrações de 5 e 50 μg em qualquer temperatura de síntese (100, 500, 650 e 800°C) não alteram estatisticamente a viabilidade e proliferação das CTM-TAs.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Células-tronco mesenquimais	1
1.2. Isolamento de CTM-TAs	3
1.3. Nanomateriais e seus efeitos na terapia celular	3
2. MATERIAL E MÉTODOS	6
2.1. Isolamento e cultura de células-tronco mesenquimais utilizando o método não enzimático	6
2.2. Caracterização das células-tronco mesenquimais por Citometria de Fluxo	6
2.3. Ensaio de proliferação celular MTT	7
2.4. Unidade Formadora de Colônias – Teste de clonogenicidade	9
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
3.1. Isolamento, cultura e caracterização de CTM-TAs	11
3.2. Ensaio de proliferação celular MTT	12
3.3. Unidade formadora de colônia – Teste de clonogenicidade	14
4. CONCLUSÃO	19
5. PERSPECTIVAS FUTURAS	20
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1. INTRODUÇÃO

1.1. Células-tronco mesenquimais

As células-tronco são células indiferenciadas com a capacidade de autorrenovação, ou seja, capazes de se multiplicar, mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos. Além disso, é capaz de se diferenciar em diversos tipos celulares, tais como osteoblastos, condrócitos, adipócitos, miócitos, hepatócitos e células neuronais (BYDŁOWSKI et al., 2009). As células-tronco estão classificadas em embrionárias e adultas e devido a questões éticas, a utilização de células-tronco embrionárias tem sido limitada, o que faz com que o foco das pesquisas seja as células-tronco adultas (WITKOWSKA-ZIMNY et al., 2011). As células-tronco embrionárias são encontradas em embriões em formação e as células-tronco adultas podem ser encontradas, como por exemplo, na medula óssea, polpa de dente de leite e tecido adiposo (ZATZ, 2011).

Células-tronco mesenquimais (CTMs) são células multipotentes não hematopoiéticas de origem mesodérmica, que estão presentes em diversos órgãos pós-natais e tecidos conjuntivos (MIZUNO, 2012). Por não existirem marcadores específicos para CTMs, foi necessário estipular um padrão de características para identifica-las. No ano de 2006, a International Society for Cellular Therapy (ISCT) estabeleceu um critério de caracterização para as CTMs como apresentar aderência ao plástico quando mantidas em cultura padrão, morfologia semelhante a fibroblastos, expressão dos antígenos (marcadores de superfície) CD29, CD73, CD90 e CD105 e a não expressão dos antígenos CD34, CD45, CD14, CD79 e o HLA-DR (KEATING, 2006). Vale ressaltar que há diferença na expressão de alguns marcadores de superfície, por influência de células acessórias nas passagens iniciais, fonte do tecido, espécie, método de isolamento e cultura, como por exemplo, o antígeno CD106 que é expresso em CTMs, mas não em células de lipoaspirado processado (CHAMBERLAIN et al.,

2007). Além destes marcadores, as CTMs também podem expressar CD13, CD29, CD166 e derivados de fatores de crescimento de um receptor α (RANKIN, 2012).

O tecido adiposo é uma fonte abundante de células-tronco, sendo de fácil acesso e considerado um bom reservatório de células-tronco adultas potenciais. Diversos trabalhos já demonstraram de maneira independente que as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) podem se diferenciar *in vitro* em diversos tipos celulares, incluindo adipócitos, condrócitos, osteócitos, miócitos, hepatócitos e células endoteliais, epiteliais e neuronais, o que as tornaram muito vantajosas para a engenharia de tecidos (MITCHELL et al., 2006). As CTM-TAs, como os outros tipos, apresentam características biológicas que mostram grande potencial para promover reparo funcional em perdas teciduais como o infarto do miocárdio (MIYAHARA et al., 2006), perda óssea (LEE et al., 2009), isquemias renais e neuropatias (ROUXA et al., 2011), além de tratar de defeitos traumáticos nos ossos e de fístulas em pacientes com a doença de Crohn (GENTILE et al., 2012). Também não há nenhum risco de rejeição imunológica com células autólogas derivadas do tecido adiposo (KONNO et al., 2013).

Vários estudos pré-clínicos na medicina regenerativa em diversas áreas foram realizados comprovando a eficácia do uso de CTM-TAs (MIZUNO, 2012). O tecido adiposo contém um estroma de suporte que facilmente pode ser isolado (ZUK et al., 2002) e coletado em abundância sem provocar prejuízo ao doador (WITKOWSKA-ZIMNY et al., 2011) ou desconforto ao paciente (MIZUNO et al., 2012), além de que, este tecido é normalmente descartado em cirurgias, principalmente estéticas.

Como as células-tronco tem grande capacidade de se diferenciarem em diversos tipos celulares, tornaram-se uma fonte atraente para terapias celulares, sendo consideradas como uma nova ferramenta terapêutica para reparação ou regeneração de órgãos danificados (GHORBANI et al., 2013). Além disso, são também capazes de modular as funções celulares

envolvidas nestes processos de reparação e a capacidade de regenerar um órgão inteiro ou regenerar partes de um tecido lesado conferindo a estas células um enorme potencial no tratamento de diversas doenças (MACHADO et al., 2015).

1.2. Isolamento de CTM-TAs

É comum proceder ao isolamento das CTM-TAs por método enzimático utilizando a enzima colagenase em busca de uma população heterogênea de células (MARKARIAN et al., 2013). Porém esse procedimento é considerado desfavorável se for levado em consideração seu alto custo e seu longo tempo de execução para um uso terapêutico, onde poderá ser gasto muito tempo e reagentes com valor significativo sem repetidos isolamentos. Além disso, a metodologia de isolamento enzimático oferece grande risco de contaminação para o material já que este procedimento envolve muitas etapas de manipulação e quando a quantidade de lipoaspirado é pequena esse método não adquire CTMs suficientes para serem isoladas e posteriormente caracterizadas (GHORBANI et al., 2013).

Segundo Ghorbani e seus colaboradores (2013), com esses pontos desfavoráveis na utilização do método enzimático para o isolamento das CTM-TAs, existem atualmente métodos de isolamento não enzimático onde o isolamento das células-tronco mesenquimais é realizado utilizando-se apenas soro fetal bovino. As vantagens de se utilizar o método não enzimático é devido a rápida execução do procedimento e seu baixo custo, além de conter poucas etapas de manuseio da amostra, diminuindo possibilidades de contaminação.

1.3. Nanomateriais e seus efeitos na terapia celular

De acordo com o Instituto de Física de São Carlos – Faculdade de São Paulo (USP), o estudo com nanomateriais para a medicina regenerativa tem permitido, ao longo do tempo, um melhor crescimento e reparação de tecidos, como tecidos ósseos, devido a aplicação de

nanopartículas. Atualmente, há pesquisadores que recobrem próteses, sendo compostas de titânio ou polímero, com camadas de nanopartículas com hidroxiapatita. Assim, o processo de crescimento dos tecidos ósseos sobre as próteses ocorre de maneira bem mais rápida do que o comum.

A nanobiotecnologia está crescendo a uma taxa exponencial e com isso surgem consequências benéficas e toxicológicas para a saúde e para o meio ambiente (ARORA et al., 2012). Segundo Cancino (2014), os estudos de padronização e validação de nanopartículas dispersas em meios biológicos já estão sendo otimizados. As características atraentes dos nanomateriais levaram a aplicação de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) na área das ciências da vida, assim como nas áreas da biotecnologia, farmacêutica, cosmética, têxtil (IAVICOLI et al., 2011), indústrias de papel, plástico, alimentos, embalagens, vernizes (TUCCI et al., 2013) e tintas (PEREIRA, 2010), porém estudos indicam níveis de toxicidade aguda e crônica com o uso desse nanomaterial.

Estudos *in vitro* (acelular e celular) e de toxicidade *in vivo* utilizando modelos apropriados (células, animais e plantas) são necessários para avaliar os efeitos biológicos de exposição aguda e crônica dos nanomateriais e que poderia levar à toxicidade. A maioria dos estudos atuais utilizam modelos *in vitro* e se concentram principalmente em pontos de toxicidade que lidam com viabilidade celular, ou seja, a apoptose, necrose, entre outros. Estes tipos de estudos são absolutamente necessários (PETERSEN et al., 2010).

Ainda não é simples chegar a um consenso sobre a toxicidade das nanopartículas de TiO_2 . Este fato pode ser explicado pela toxicidade deste material ser afetada por um grande número de fatores, como as dimensões e forma da partícula, a sua área superficial específica, a concentração, a polidispersibilidade e diversos parâmetros do meio como pH, concentração iônica, composição, entre outros (PEREIRA, 2010).

Existem registros de estudos sobre aplicações de nanopartículas na medicina que não se restringem à sua ação bactericida, mas também o estudo de sua eficiência no tratamento ou prevenção contra o câncer (SEO et al., 2007). Também há estudos que mostram a biocompatibilidade dessas nanopartículas de TiO_2 em processos de terapia celular favorecendo um crescimento ósseo significativo, demonstrando alta seletividade celular e forte evidência de osteogênese (ALMEIDA, 2011).

Apesar dos avanços da nanomedicina em sistemas diagnósticos e terapêuticos, o potencial efeito na saúde humana devido à exposição prolongada ainda não foi estabelecido. A limitada quantidade de informações acerca dos efeitos tóxicos de nanomaterias faz com que a nanomedicina enfrente várias questões regulatórias em um processo complexo e dispendioso, mas necessário, independentemente do nanomaterial ou aplicação (ALMEIDA, 2011).

A utilização de nanopartículas em conjunto com células-tronco, apresenta um grande avanço na terapia celular, possibilitando procedimentos mais eficientes e rápidos, como por exemplo, em processos de regeneração óssea. Porém, estudos são necessários com esses nanomateriais para se conhecer o tempo, a dose e a temperatura de síntese ideal para a utilização em terapia celular, como é o caso do TiO_2 . Este projeto de pesquisa teve como objetivo analisar a capacidade de proliferação e de viabilidade celular utilizando diferentes concentrações de nanopartículas de TiO_2 sintetizadas nas temperaturas de 100, 500, 650 e 800°C em células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolamento e cultura de células-tronco mesenquimais utilizando o método não enzimático

As células-tronco mesenquimais foram adquiridas por meio da obtenção de material doado por um médico associado ao projeto com consentimento de seu paciente e de acordo com a aprovação do projeto de isolamento de células para o Comitê de Ética (nº 336.126). Assim, foi realizado o isolamento de células-tronco mesenquimais, que foram mantidas em meio de cultura seguindo um protocolo de isolamento não enzimático.

O material lipoaspirado, cedido em duas seringas contendo um volume total de 60ml, foi levado ao Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e conservado no gelo. Para dar início ao procedimento, foi adicionado 30ml do material lipoaspirado em três tubos falcon de 50ml com cerca de 20ml de Soro Fetal Bovino (SFB) e em seguida, centrifugado a 1500 rpm por cinco minutos. Após a centrifugação, o material foi mantido por cerca de 1 hora em repouso para que decantasse, possibilitando a retirada da camada de sague (inferior) e óleo (superior). Em seguida, foi adicionado o Tampão Fosfato Salino (PBS 1x) até completar os 50ml do tubo falcon, afim de retirar a gordura restante. A amostra foi centrifugada novamente a 1500 rpm e depois foi coletado um fragmento de tecido adiposo e o mesmo colocado nos cantos das garrafas de 25cm² de cultura e cobertos com cerca de 2,5ml de SFB. Depois de 24hs, foi adicionado meio DMEM baixa glicose com 20% de SFB cobrindo as amostras.

As garrafas de cultura primária ficaram cerca de quinze dias em cultivo até atingirem uma confluência (80% do fundo da garrafa coberto por células). Após esta etapa, seguiu-se a caracterização das células.

2.2. Caracterização das células-tronco mesenquimais por Citometria de Fluxo

As células foram tripsinizadas e contadas na câmara de Neubauer utilizando azul de tripan. Preparou-se oito tubos contendo 1×10^6 células/tubo de citometria, devidamente identificados. As células foram ressuspensas em 1ml de meio DMEM completo (DMEM + 10% SFB). Em seguida, foi passado parafilme na boca dos tubos e colocados na incubadora de CO₂ a 37°C por 1 hora.

Depois, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm durante cinco minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1ml de PBS/BSA 1% nas células, homogeneizando manualmente e levando para a centrífuga novamente. Esta etapa do procedimento é repetida por mais duas vezes.

Os marcadores adicionados nos tubos foram:

Tubo 1- Células-tronco sem marcação (controle negativo);

Tubo 2- Células-tronco marcadas com isotipos;

Tubo 3- Células-tronco marcadas com CD90 FITC;

Tubo 4- Células-tronco marcadas com CD146 PE;

Tubo 5- Células-tronco marcadas com CD184 PE;

Tubo 6- Células-tronco marcadas com CD105 APC;

Tubo 7- Células-tronco marcadas com CD45 PE e CD14 PE/CY7;

Tubo 8- Células-tronco marcadas com CD45 PE e CD90 FITC.

Os tubos foram incubados durante 30 minutos ao abrigo de luz, seguida por lavagem com PBS e centrifugado a 1500rpm por cinco minutos, este procedimento foi repetido mais uma vez.

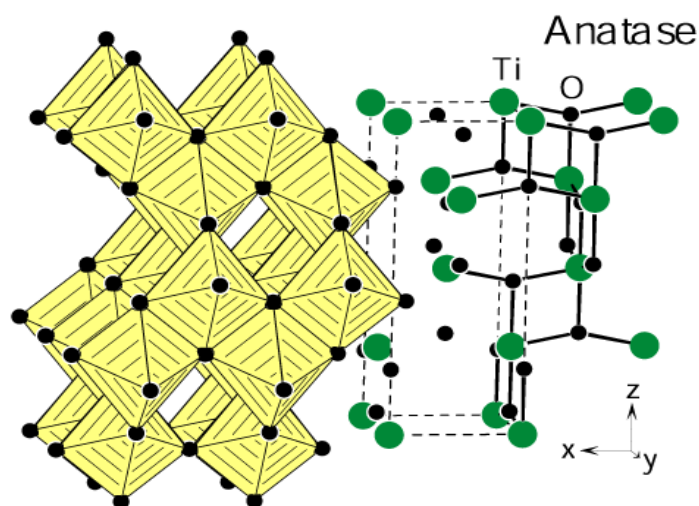
As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo Accuri.

2.3. Ensaio de viabilidade celular MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)

Para a realização da técnica de MTT foi necessário cultivar as células-tronco mesenquimais até atingirem 80% de confluência em uma garrafa de 75cm² de cultura. Em seguida, as células foram tripsinizadas, coradas com azul de tripan e contadas na câmara de Neubauer e assim, distribuídas em uma placa de 96 poços, contendo em cada poço 2x10⁴ de células em 200µl de meio DMEM a 10% de SFB e incubadas por 24hs na incubadora de CO₂ para aderência e estabilização das células na placa.

As células foram submetidas a quatro dosagens diferentes de nanopartículas de TiO₂ – 5, 50, 100 e 250µg em solução. Essas nanopartículas foram sintetizadas pela Profa. Dra. Anielle Christine Almeida Silva e o Prof. Dr. Noelio Oliveira Dantas no Laboratório de Física da UFU, onde as estruturas, formas e tamanhos desse material são determinados de acordo com as temperaturas em que são tratadas.

Neste projeto de pesquisa as nanopartículas de TiO₂ utilizadas foram sintetizadas nas temperaturas de 100, 500, 650 e 800°C e em cada temperatura tem-se um diâmetro e uma porcentagem de fase polimórfica diferente. A literatura também traz essas fases nomeadas como nanocristais (IAVICOLI et al., 2011). As fases são de três formas distintas – Anatase, Rutila e Brookite (Figura 1) – que, sozinhas ou associadas entre si, constituem as nanopartículas.



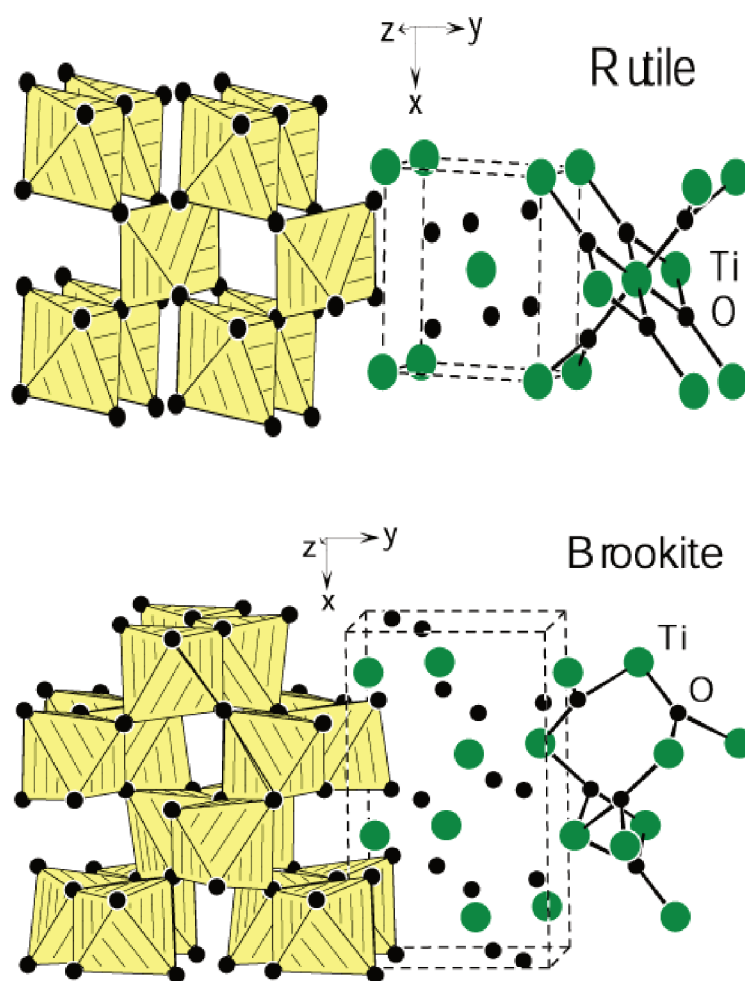


Figura 1: Fases que compõe as nanopartículas de TiO_2 .

As nanopartículas na temperatura de 100°C (durante 24hs) atinge o diâmetro de $4,4\mu\text{m}$ com 100% de sua estrutura constituída por anatase; em 500°C (durante 24hs) o diâmetro é de $8,5\mu\text{m}$ com 91,06% de anatase e 8,94% de rutila; em 650°C (durante 24hs) o diâmetro é de $32\mu\text{m}$ com 35,44% de anatase e 64,56% de rutila e em 800°C (durante 24hs) o diâmetro é de $44,1\mu\text{m}$ com 84,07% de rutila e 15,93% de brookite.

Além das concentrações e temperaturas, neste experimento foram estabelecidos três controles: controle positivo com células-tronco e meio DMEM a 10% de SFB; controle negativo com células-tronco e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) que provoca a morte celular em temperatura ambiente; e o branco que continha apenas meio DMEM a 10% de SFB, para

analisar se o meio não interferia nos resultados. Cada teste (concentração, temperatura e controles) foram feitos em triplicata para diminuir a possível margem de erro dos resultados (Figura 2).

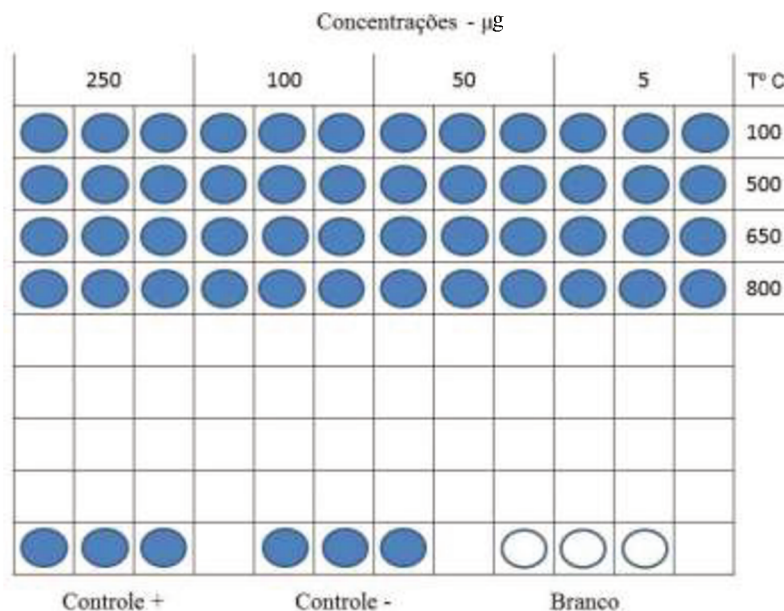


Figura 2: Layout da placa de 96 poços para realização do teste de MTT.

Após as células ficarem incubadas por 24hs, o meio foi trocado e foi adicionado nos poços as nanopartículas de TiO_2 , sendo que a quantidade foi de acordo com as concentrações trabalhadas. As células ficaram sob o efeito das nanopartículas por 24hs e ao encerrar esse período elas foram lavadas com PBS para retirar o excesso de nanopartículas e em seguida, foi adicionado meio DMEM a 10% de SFB com 20 μl de solução de MTT diluído em PBS e incubado por 4hs a temperatura ambiente.

Ao término da incubação, foi adicionado sobre as células 50 μl da solução de SDS/N-dimetilformamida para interromper a ação do MTT e a placa foi envolvida com papel alumínio para que o contato com a luminosidade fosse reduzido. A placa ficou incubada por mais 24hs e em seguida, foi realizada a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 570nm.

2.4. Unidade Formadora de Colônias – Teste de clonogenicidade

Neste ensaio as células utilizadas foram descongeladas, centrifugadas a 1500rpm e colocadas em garrafa de 25cm² de cultura com 5ml de meio DMEM a 10% de SFB até alcançarem 80% de confluência. Em seguida, as células foram distribuídas em três placas contendo seis poços cada, onde em cada poço foi adicionado 1×10^3 de células com 2ml de meio DMEM a 10% de SFB e colocadas na incubadora de CO₂ por 24hs para adesão das células na placa.

Nesta metodologia também foram testados as quatro temperaturas em que as nanopartículas de TiO₂ foram sintetizadas – 100, 500, 650 e 800°C – onde cada temperatura foi submetida a quatro concentrações diferentes – 5, 50, 100 e 250µg –, além disso, foi estabelecido um controle positivo somente com células e sem nanopartículas. Após as células ficarem 24hs incubando, o meio de cultivo foi trocado e em cada poço foi adicionado 2ml de meio DMEM a 10% de SFB com o tratamento (nanopartículas em concentrações diferentes de cada temperatura estipulada). O controle se manteve com o meio completo sem nanopartículas.

O meio de cultura contendo nanopartículas dos poços foi trocado a cada três dias de cultivo, sendo lavados com PBS entre uma troca e outra para a retirada do excesso de nanopartículas para não ocorrer erro de leitura. Depois de cultivar as células nas placas por 15 dias, as células foram fixadas com acetona e metanol por 20 minutos e depois coradas em solução de cristal de violeta 1%, por 10 minutos. Em seguida, as colônias foram observadas e contadas em microscopia ótica.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento, cultura e caracterização de CTM-TAs

Através do protocolo de isolamento não enzimático de CTM-TAs obteve-se uma cultura de células com morfologia semelhante à de fibroblasto em monocamada e aderentes ao plástico, já cumprindo com os primeiros requisitos para caracterização das células-tronco mesenquimais (Figura 3).

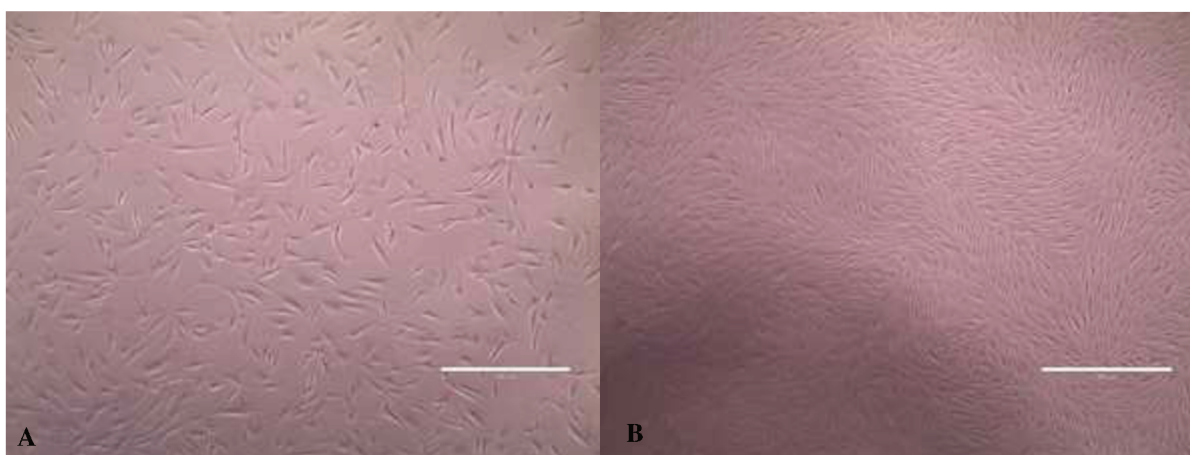


Figura 3: Morfologia das CTM-TA em segunda passagem, evidenciando suas características de adesão à garrafa e distribuição em monocamada com 80% de confluência (A) e 100% de confluência (B). Fotografia obtida através de microscopia eletrônica nos aumentos de 10x e 4x, respectivamente.

As CTM-TAs foram também caracterizadas pela avaliação de seus marcadores de superfície utilizando a técnica de citometria de fluxo apresentando os resultados de presença e ausência dos antígenos, de acordo com o determinado pela ISCT (KEATING, 2006). Os marcadores de superfície CD90 e CD105 foram expressos (Figura 4), sendo que CD90 foi expresso em mais de 90% da população celular quando comparado ao CD45 (Figura 5)

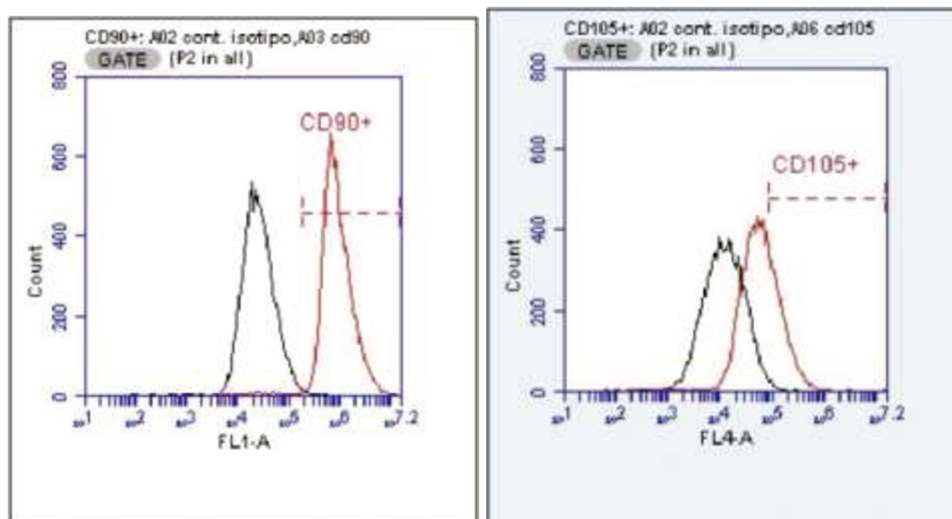


Figura 4: Análise dos marcadores CD90 e CD105 nas CTM-TAs por citometria de fluxo.

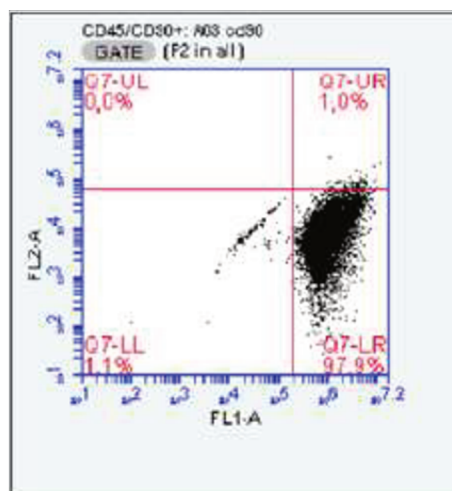


Figura 5: Análise da expressão do marcador CD90 em mais de 90% da população de CTM-TAs por citometria de fluxo.

Os marcadores de superfície CD14, CD146 e CD184 não foram expressos conferindo os requisitos de identificação e caracterização de CTMs de acordo com os critérios estabelecidos pela ISCT (Figura 6)

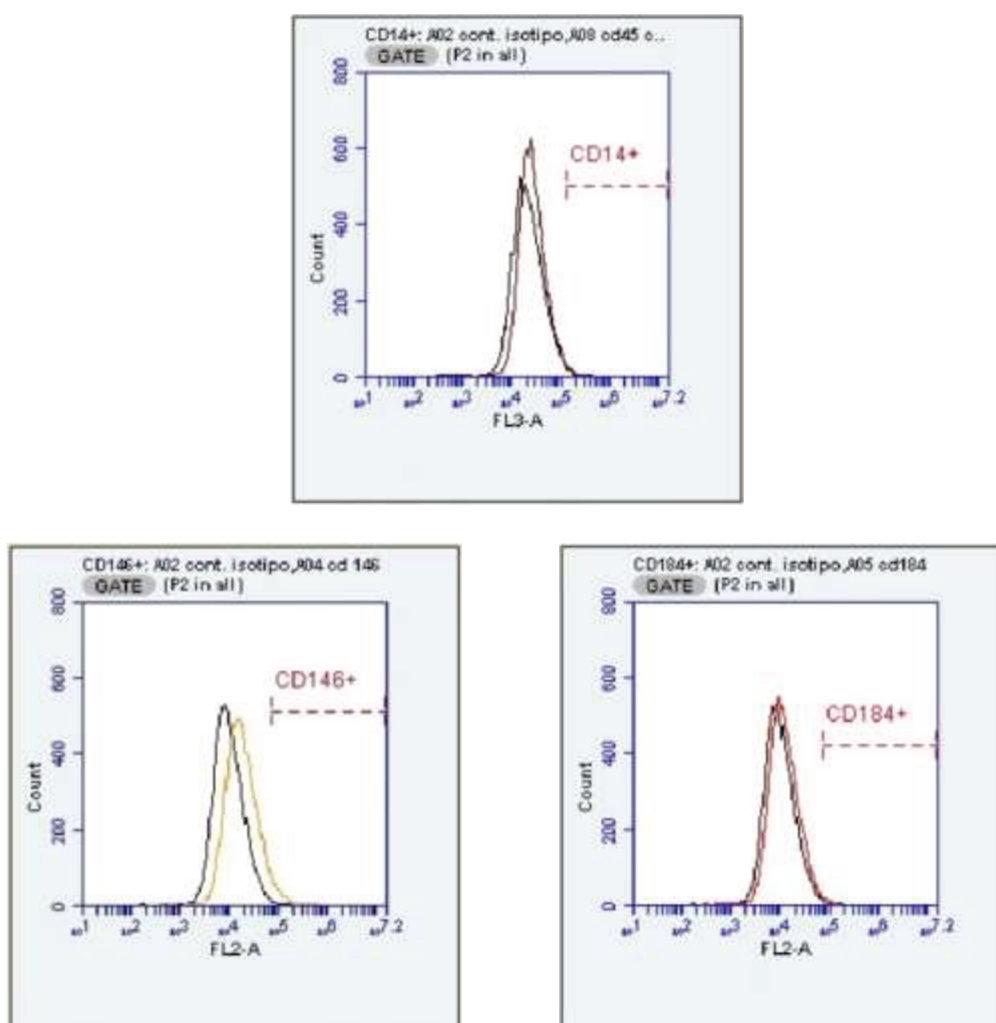


Figura 6: Análise dos marcadores CD14, CD146 e CD184 nas CTM-TAs por citometria de fluxo.

3.2. Ensaio de viabilidade celular MTT

Este experimento visou avaliar a porcentagem de viabilidade das CTM-TAs quando submetidas a diferentes tipos (forma de síntese identificadas pela temperatura) e concentrações de nanopartículas de TiO_2 .

Após a quantificação da viabilidade celular em porcentagem, os dados obtidos do experimento foram submetidos a análises estatísticas pelo método Two Way Anova utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. As análises estatísticas foram feitas comparando a viabilidade celular entre todas as concentrações e controles dentro de cada temperatura individualmente. Nas temperaturas de 100, 500, 650 e 800°C as concentrações de 5, 50 e

100µg, incluindo o controle positivo, tiveram diferenças significativas quando comparadas com a concentração de 250µg (Figura 7).

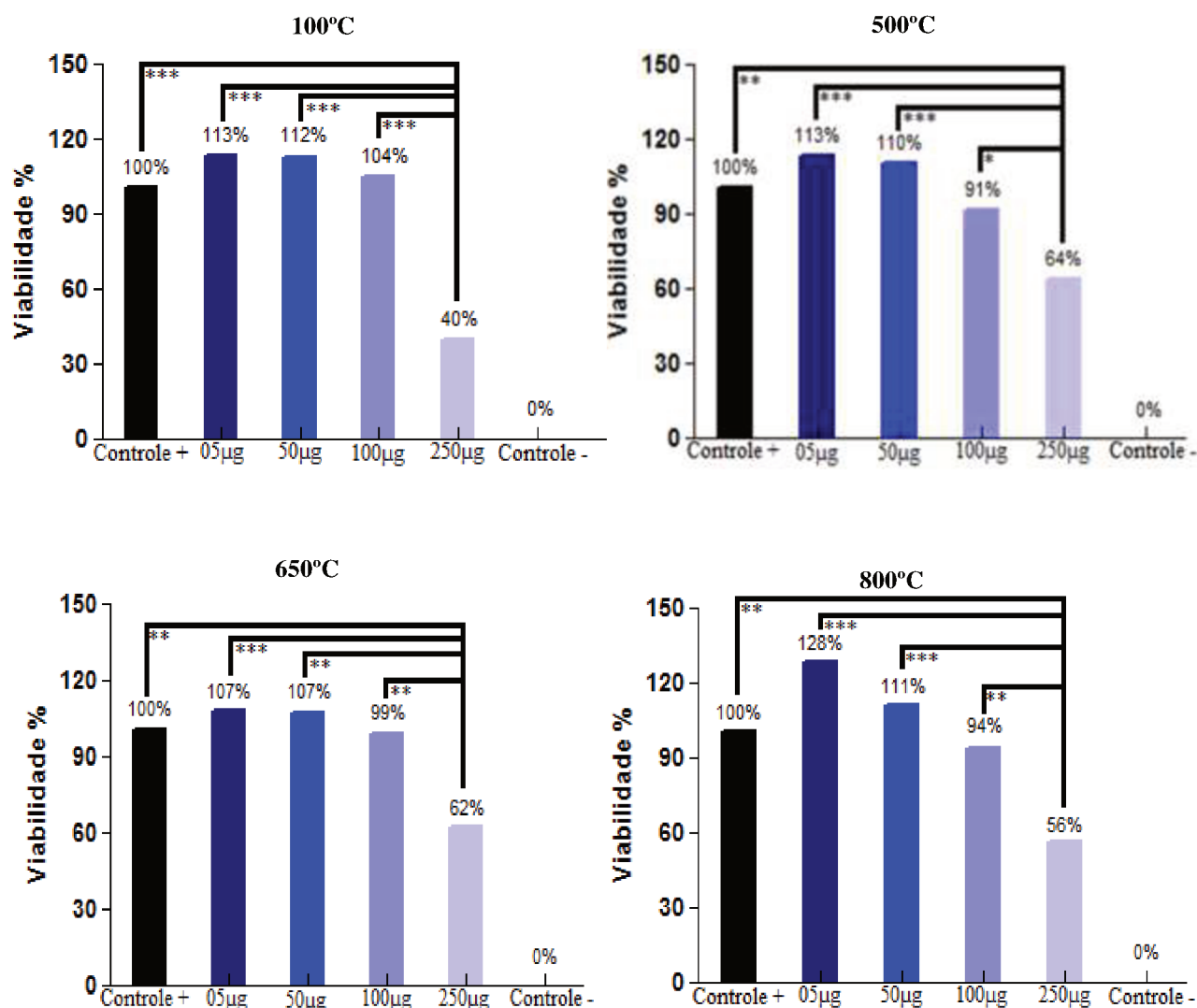


Figura 7: Análise da viabilidade celular na presença de nanopartículas de TiO₂ nas temperaturas de 100, 500, 650 e 800°C nas concentrações de 5, 50 e 100µg com relação a concentração de 250µg.

*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

Porém na temperatura de 800°C, além das diferenças significativas já mencionadas, houve diferença significativa entre as concentrações de 5 e 100µg (Figura 8).

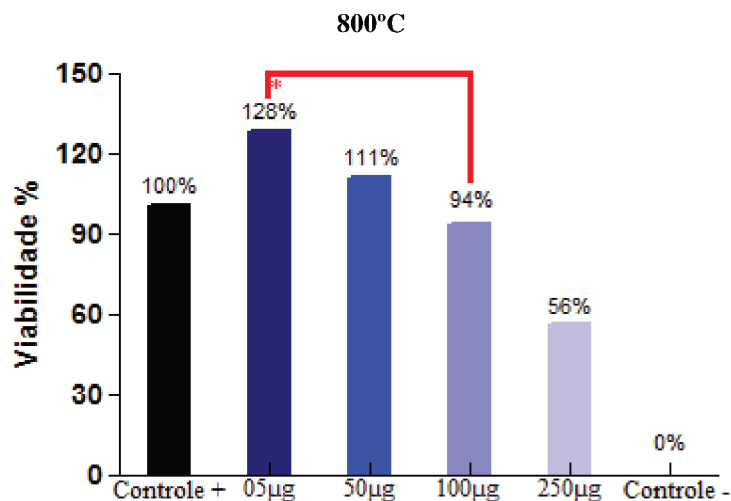


Figura 8: Análise da viabilidade celular na presença de nanopartículas de TiO_2 na temperatura de 800°C entre as concentrações de 5 e $100\ \mu\text{g}$.

*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

No trabalho desenvolvido por Iavicoli et al. (2011) fica evidente que existem diversos trabalhos de estudos *in vitro* envolvendo nanopartículas de TiO_2 , tendo como umas das principais avaliações para determinar sua toxicidade o teste de MTT (ZHU et al., 2009; WADHWA et al., 2011; ONGL et al., 2014), mesma metodologia utilizada neste trabalho.

De acordo com Lupu et al. (2013), é de grande importância a realização de outros testes, além do MTT, para avaliar a viabilidade celular que são expostas a um determinado nível de toxicidade de nanomateriais de TiO_2 , pois no teste de MTT podem ocorrer interferências colocando em dúvida os resultados. Devido a essas divergências e supostas dúvidas nos resultados em experimentos de MTT, foi realizado também nesta pesquisa o teste de clonogenicidade confirmando os resultados do teste de MTT nesta pesquisa.

3.3. Unidade formadora de colônia – Teste de clonogenicidade

Neste experimento foi analisada a capacidade de clonogenicidade das CTM-TAs, ou seja, o quanto o desenvolvimento e multiplicação celular são comprometidos quando submetidas às nanopartículas de TiO_2 em concentrações e temperaturas de sínteses diferentes, através da formação de colônias (Figura 9).

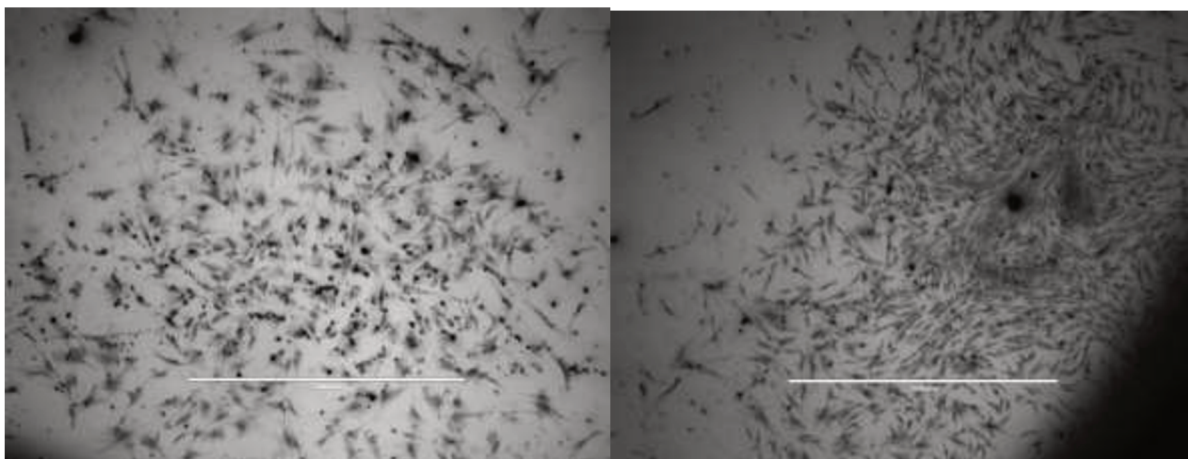


Figura 9: CTM-TA em formação de colônia (mínimo 50 células/colônia) com nanopartículas de TiO_2 depois de 15 dias em cultura celular.

As unidades formadoras de colônias originam-se de uma única célula sendo consideradas clonadas (PARENT- MASSIN, 2001).

No ensaio de clonogenicidade é possível analisar diferentes expressões provocadas pelo efeito toxicológico. Estes efeitos tóxicos podem se apresentar através da morte celular, por bloqueios, e diminuição ou aumento do número de mitose e como consequência, alterando o número de colônias formadas no final do experimento. Também é possível analisar interações dos fatores que podem afetar as comunicações intercelulares (NASCIMENTO, 2006).

Após análise dos resultados observou-se que a concentração de $5\mu\text{g}$ nas temperaturas de 100 e 500°C , não se mostrou tóxica já que o número de colônias formadas foi elevado se comparada com as outras concentrações e temperaturas. Com exceção da concentração de $50\mu\text{g}$ na temperatura de 800°C , que também não expressou muita toxicidade na formação de colônias. Nas concentrações mais altas, 100 e $250\mu\text{g}$, ficou evidente que as nanopartículas de TiO_2 são prejudiciais ao desenvolvimento celular (Figura 10).

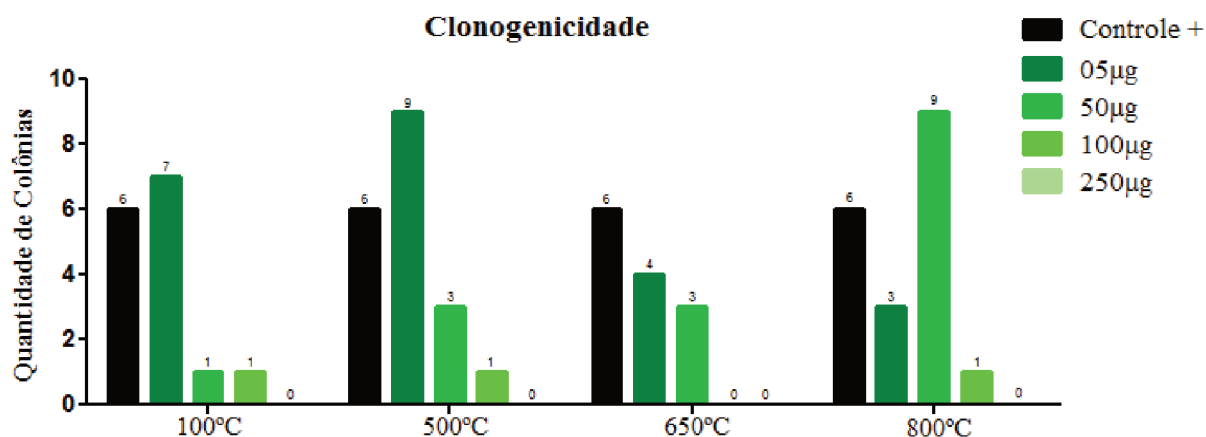


Figura 10: Quantidades de colônias contadas de acordo com as concentrações e temperaturas em que as nanopartículas de TiO₂ foram sintetizadas.

É possível observar após análise estatística utilizando a metodologia Two Way Anova utilizando o programa GraphPad Prism 5.0, que houve diferença significativa em relação a quantidade de colônias formadas de acordo com a concentração e temperatura de síntese das nanopartículas utilizadas.

Foi observado que apenas em duas temperaturas, 500 e 800°C, houve uma diferença significativa entre as concentrações de 5 e 250µg e entre 50 e 250µg, respectivamente (Figura 11).

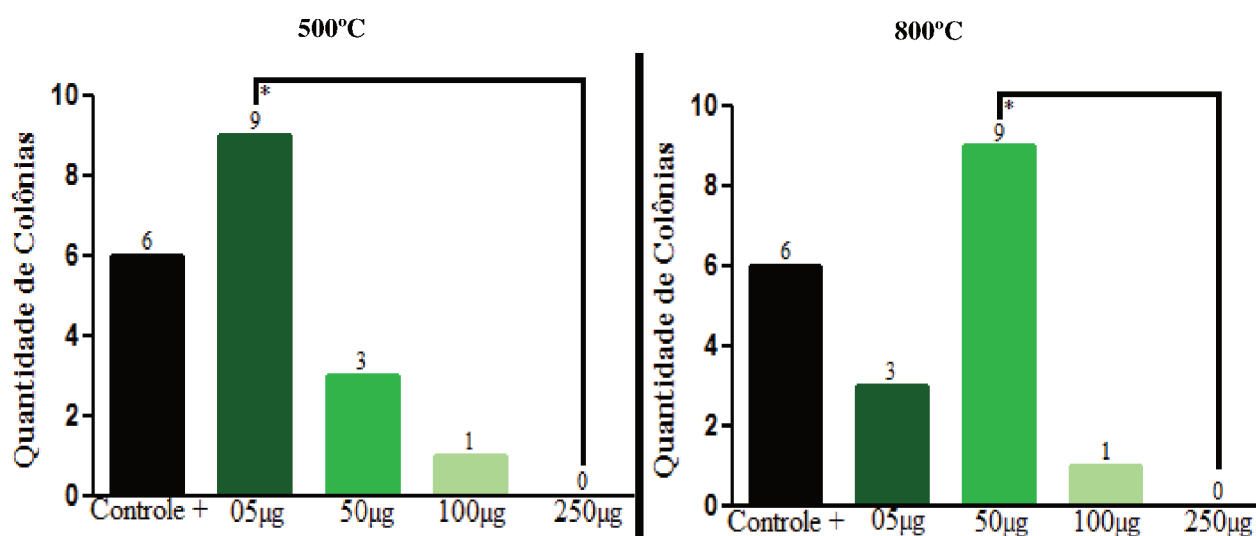
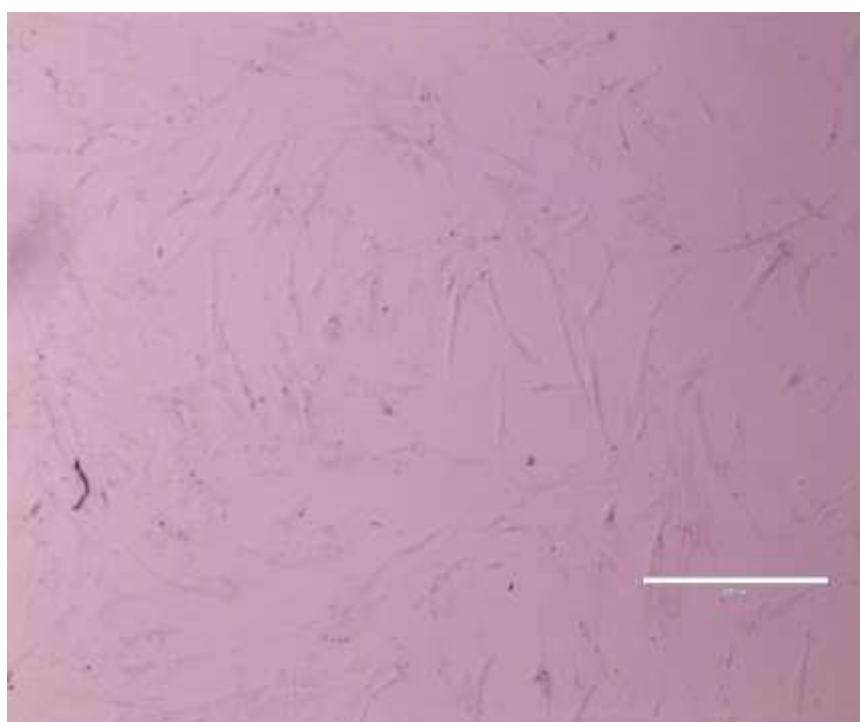


Figura 11: Quantificação da Unidade Formadora de Colônia nas temperaturas de 500°C e 800°C entre as concentrações de 5 e 250µg e 50 e 250µg, respectivamente.

*: $P < 0,05$.

As nanopartículas TiO_2 em concentrações mais elevadas como mostrado neste trabalho, 100 e 250 μg , se mostraram inviáveis. Por se encontrarem em maior quantidade, elas podem se aglomerar perdendo sua estruturação nanométrica, alterando assim sua caracterização e se tornando mais tóxica. Um material só poder ser nomeado como nanopartícula se o mesmo apresentar características diferentes das iniciais, como propriedades magnéticas, biológicas e estruturais, quando comparadas em tamanho maior (BORM et al., 2006; NEL et al., 2006). Na literatura existem trabalhos que mostram que características físico-químicas das nanopartículas estão diretamente associadas aos seus efeitos biológicos (DONALDSON et al., 2004; TSUJI et al., 2006) e as nanopartículas de TiO_2 tem um efeito toxicológico muito diferente do seu perfil homólogo a granel (IAVICOLI et al., 2011).

Foi possível observar que as nanopartículas, quando em menor concentração, eram pouco visíveis em cultura com as CTM-TAs (Figura 12), mas quanto maior foi a concentração de nanopartículas de TiO_2 – 50, 100 e 250 μg – mais se aglomeraram ficando evidente sua aparição junto as CTM-TAs (Figuras 13, 14 e 15, respectivamente).



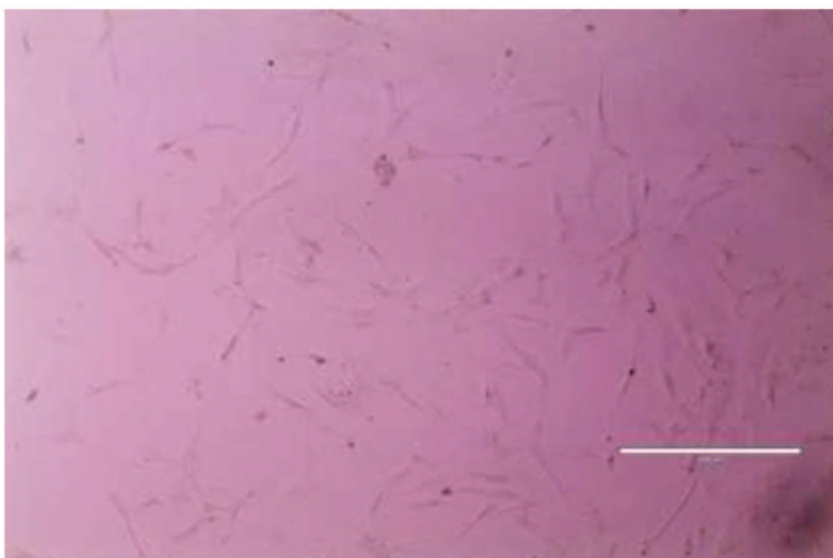


Figura 12: CTM-TAs em cultivo submetidas a concentração de 5 μ g de nanopartículas de TiO₂.

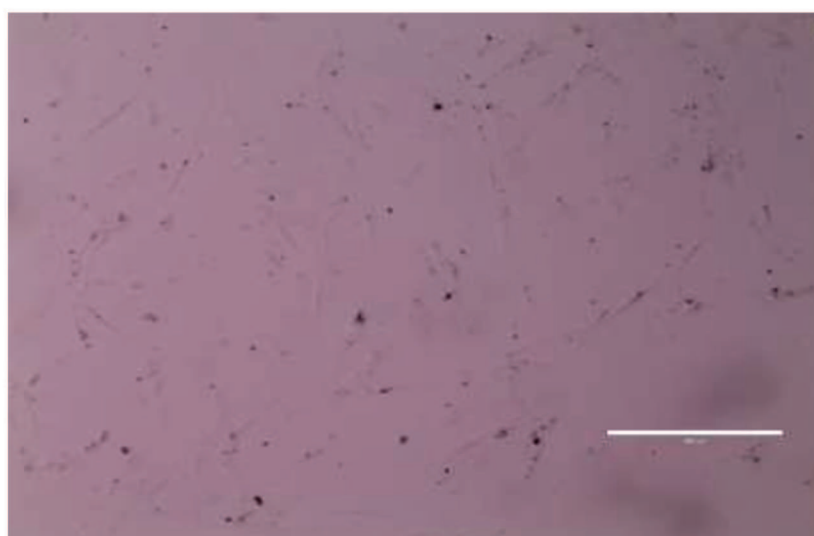
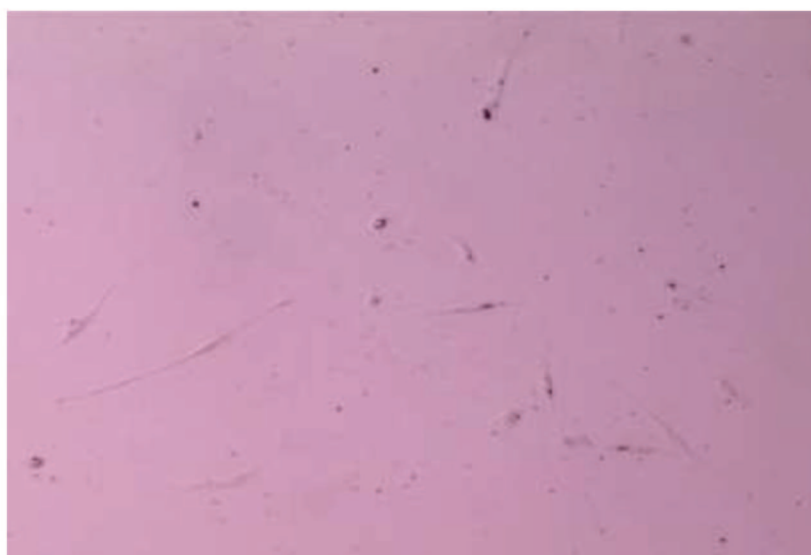
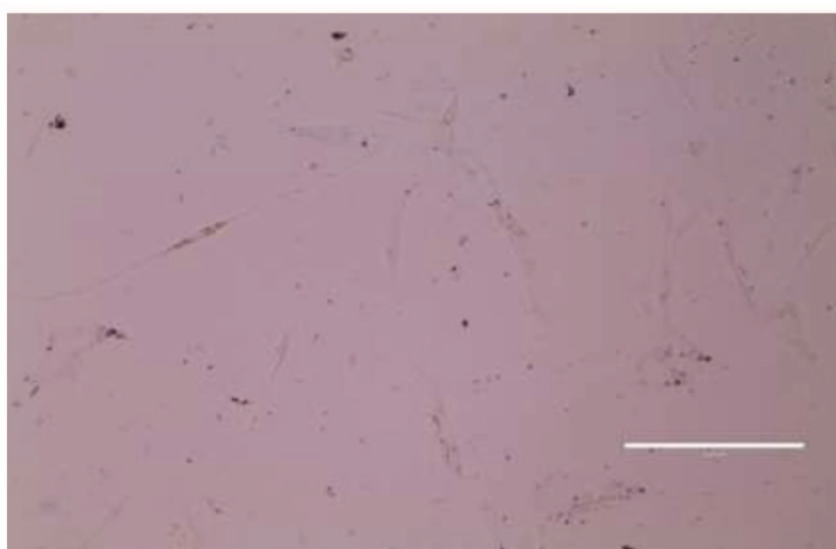




Figura 13: CTM-TAs em cultivo submetidas a concentração de 50 μ g de nanopartículas de TiO₂.



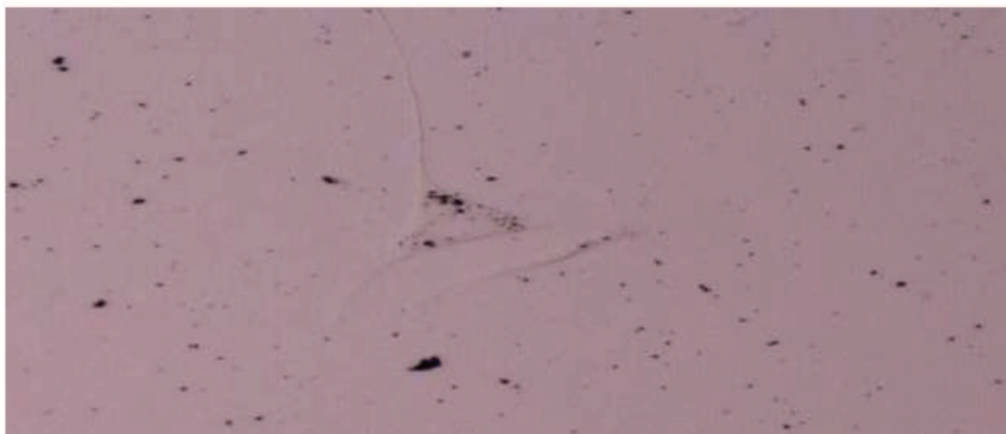


Figura 14: CTM-TAs em cultivo submetidas a concentração de 100 μ g de nanopartículas de TiO₂.

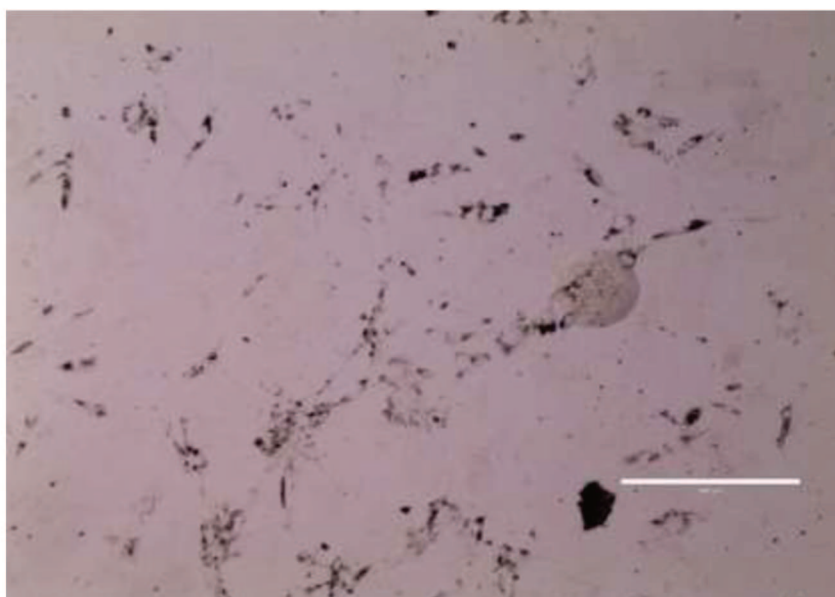
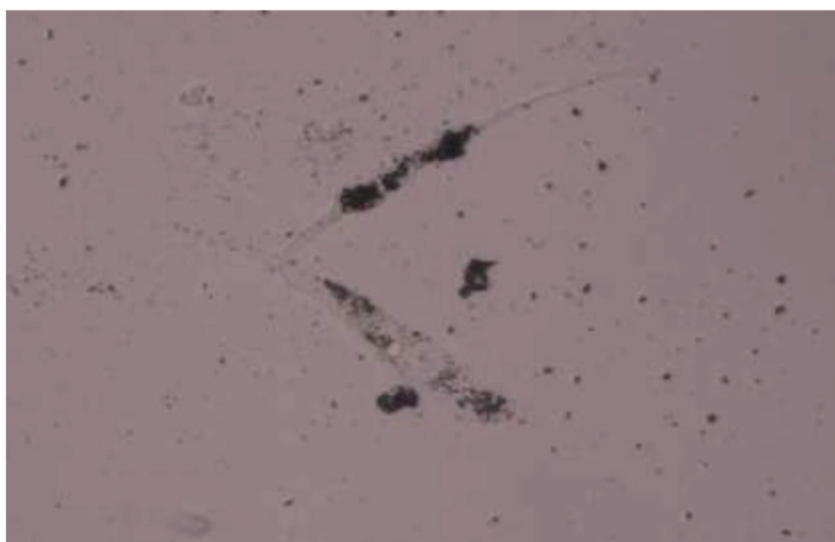




Figura 15: CTM-TAs em cultivo submetidas a concentração de 250µg de nanopartículas de TiO₂.

Em ambos os testes que avaliaram diferentes concentrações em quatro temperaturas de sínteses de TiO₂, foi possível observar que a utilização de baixas concentrações de nanopartículas de TiO₂ são mais viáveis e seguras quando os fatores relevantes são a viabilidade e o desenvolvimento/multiplicação celular em CTM-TAs. Há estudos que reforçam que o TiO₂ apresenta baixa toxicidade (ILSI RISK SCIENCE INSTITUTE, 2000) e quando em partículas ultrafinas – 20 a 80nm – tem maior atividade biológica (BAGGS, 1997).

Como já mencionado anteriormente as nanopartículas de TiO₂ apresentam três estruturas distintas: anatase, rutila e brookite, sendo as duas primeiras as mais comuns, uma vez que brookite é instável (PORTO, 2008). Neste trabalho ficou evidente que as nanopartículas sintetizadas nas temperaturas de 100 e 500°C os resultados, de modo geral, foram melhores, mostrando que essa forma de síntese com anatase pura ou anatase associada a rutila, respectivamente, influenciaram pouco na viabilidade e proliferação das CTM-TAs. Porém, Sayes et al. (2007) avaliaram *in vitro* a toxicidade do TiO₂ em anatase, rutila e anatase associada a rutila em células epiteliais e fibroblastos nas concentrações de 3 e 30µg e concluíram que as partículas de anatase foram mais tóxicas do que as de rutila.

Porto (2008) menciona que a forma brookite é estável apenas em baixas temperaturas e por isso, não é muito utilizada, mas neste trabalho foram utilizadas nanopartículas de TiO_2 que foram sintetizadas a 800°C associando rutila com uma baixa quantidade de brookite e mostrando que é possível sua utilização em baixa concentração sem alterar a viabilidade (5 e 50ug) e proliferação (50ug) das CTM-TAs.

Com estudos apontando resultados tão diversos quanto a ideal forma de síntese dessas nanopartículas de TiO_2 , se torna necessário pesquisar mais a fundo os efeitos tóxicos provocados pelas nanopartículas, principalmente em relação às suas características estruturais, que segundo alguns autores, é o primeiro passo para entender completamente os efeitos negativos das nanopartículas de TiO_2 (SAYES et al., 2007; IAVICOLI et al., 2011). A classificação das nanopartículas quanto a sua síntese deve ser homogênea para estudos futuros a fim de esclarecer as propriedades físico-químicas dos nanocristais de TiO_2 e determinar seus efeitos toxicológicos (IAVICOLI et al., 2011).

4. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados deste trabalho é possível concluir que ao utilizar nanopartículas de TiO_2 nas concentrações de 5, 50 e $100\mu\text{g}$ não provoca interferências na capacidade de viabilidade das CTM-TA, se mostrando menos agressivas. Já com relação ao teste de clonogenicidade, as nanopartículas de TiO_2 na concentração de $5\mu\text{g}$ nas temperaturas de sínteses de 100, 500 e 650°C e a concentração de $50\mu\text{g}$ na temperatura de síntese de 800°C se demonstraram viáveis também não provocaram interferência no desenvolvimento das CTM-TAs.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados desta pesquisa conseguiram determinar as concentrações mais adequadas e seguras de nanopartículas de TiO_2 associadas a CTM-TA, auxiliando futuros estudos a serem realizados pelo GEP-CT (Grupo de Estudos e Pesquisas em Células-tronco), onde já está sendo desenvolvido dois projetos de pesquisa (Mestrado) envolvendo análises *in vitro* da capacidade de diferenciação óssea das CTM-TA associadas a nanopartículas de TiO_2 e um projeto (Doutorado) envolvendo análises *in vivo* da utilização de CTM-TAs associadas a nanopartículas de TiO_2 na regeneração óssea.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R. J. Síntese e Caracterização de nanocristais de TiO₂ – Avaliação de sua biocompatibilidade através de implantes intraósseos. 2011.

ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Nanotoxicology and *in vitro* studies: the need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v. 258, p. 151-165, 2012.

BAGGS R. B.; FERIN J.; OBERDORSTER G. Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats. *Vet Pathol*. v. 34, p. 592-597, 1997.

BUSCH, W.; BASTIAN, S.; TRAHORSCH, U.; IWE, M.; KÜHNEL, D.; MEIBNER, T.; SPRINGER, A.; GELINSKY, M.; RICHTER, V.; IKONOMIDOU, C.; POTTHOFF, A.; LEHMANN, I.; SCHIRMER, K. Internalisation of engineered nanoparticles into mammalian cells in vitro: influence of cell type and particle properties. *Springer*. v. 13, p. 293–310, 2011.

BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L.M.F.; JANZ, F. L. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. v. 31, p. 23-35, 2009.

CANCINO, J.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTO, V. Nanotecnologia em Medicina: Aspectos Fundamentais e Principais Preocupações. *Quim. Nova*. v. 37, No. 3, p.521-526, 2014.

CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B.; MIDDLETON, J.; Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, v. 25, p. 2739–2749, 2007.

BORM, P. J.; ROBBINS D.; HAUBOLD S.; KUHNBUSCH T.; FISSAN H.; DONALDSON K.; SCHINS R.; STONE V.; KREYLING W.; LADEMANN J.; KRUTMANN J.; WARHEIT D.; OBERDORSTER E. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol.* v. 14, p. 3-11, 2006.

< Disponível em: <http://www.if.sc.usp.br/index.php?option=comcontent&view=article&id=3355:os-desafios-da-nanotecnologia-a-servico-da-medicina&catid=7:noticias&Itemid=224>.

Acesso em: fevereiro 2016. >

DONALDSON K.; STONE V.; TRAN C. L.; KREYLING W.; BORM P. J. A. Nanotoxicology: a new frontier in particle toxicology relevant to both the workplace and general environment and to consumer safety. *Occup Environ Med.* v. 61, p. 727-728, 2004.

GENTILE, P.; ORLANDI, A.; SCIOLI, M. G.; PASQUALI, C.; BOCCHINI, I.; CERVELLI, V. Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery. *Stem Cells Translational Medicine.* v. 1, p. 230-236, 2012.

GHORBANI, A.; JALALI, A. S.; VAREDI, M. Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: A non-enzymatic method. *Tissue and Cell.* 2013.

IAVICOLI, I.; LESO, V.; FONTANA, L.; BERGAMASCHI, A. Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. v. 15, p. 481-508, 2011.

ILSI RISK SCIENCE INSTITUTE WORKSHOP PARTECIPANTS. The relevance of the rat lung response to particle overload for human risk assessment: A workshop consensus report. *Inhal Toxicol*. v. 12, p. 1-17, 2000.

KEATING A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol*. v. 13, p.419-425, 2006.

KONNO, M. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells and regenerative medicine. *Development Growth Differentiation*. v. 55, p. 309–318, 2013.

LUPU A. R.; POPESCU T.; The noncellular reduction of MTT tetrazolium salt by TiO₂ nanoparticles and its implications for cytotoxicity assays. *Toxicology in Vitro*. v. 27, p. 1443-1450, 2013.

MACHADO, C. E. S.; DIOGO, J. F.; GARCIA, V.; FERLIN, C. R.; OLIVEIRA, D. T. N.; PRATA, C. A. Células-tronco de origem dental: características e aplicações na medicina e odontologia. *Revista Odontológica de Araçatuba*. v. 36, n. 1, p. 36-40, 2015.

MARKARIAN, C.F.; FREY, G. Z.; SILVEIRA, M. D.; CHEM, E. M.; MILANI, A. R.; ELY, P. B.; HOM, A. P.; NARDJ, N. B.; CAMASSOLA, M. Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods. *Biotechnol Lett*. 2013.

MITCHELL, J. B.; MCINTOSH, K.; ZVONIC, S.; GARRETT, S.; FLOYD, Z. E.; KLOSTER, A.; HALVORSEN, Y.; STORMS, R.; GOH, B.; KILROY, G.; WU, X.; GIMBLE, J. M. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell – associated markers. *Stem Cells*. v. 24, p. 376-385, 2006.

MIZUNO, H.; TOBITA, M.; UYSAL, A. C. Concise Review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*. v. 30, p. 804–810, 2012.

MIYAHARA, Y.; NAGAYA, N.; KATAOKA, M.; YANAGAWA, B.; TANAKA, K.; HAO, H.; ISHINO, K.; ISHIDA, H.; SHIMIZU, T.; KANGAWA, K.; SANO, S.; OKANO, T.; KITAMURA, S.; MORI, H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nature Medicine*. v. 12, 2006.

NASCIMENTO, R. X. Avaliação do crescimento de unidades formadoras de colônias de células progenitoras hematopoéticas humanas criopreservadas por longo tempo após irradiação com laser de baixa potência em diferentes densidades de energia (0,1-2,0J/cm²). 2006. 39 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, São Paulo. 2006.

NEL A.; XIA T.; MADLER L.; LI N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. v. 311, p. 622- 627, 2006.

PARENT-MASSIN, D.; THOUVENOT, D. In vitro study of pesticide hematotoxicity in human and rat progenitors. *J Pharmacol Toxicol Methods*. v. 30, n. 4, p. 203-207, 1993.

PEREIRA, J. C.; Estudo do comportamento de nanopartículas de dióxido de titânio em diferentes suspensões. 2010. 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Departamento de Ciências dos Materiais, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2010.

PETERSEN, E. J.; NELSON, B. C.; Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. *Springer*. p. 613-650, 2010.

PORTO, C. H. S. Fotocatálise heterogênea em instrumental odontológico recoberto com nanopartículas TiO₂ e Ag. 2008. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ortodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2008.

ONGL, K. J.; MACCORMACK, T. J.; CLARK R. J.; EDEL, J. D.; ORTEGA V. A.; FELIX, L. C.; DANG, M. K. M.; MA, G.; FENNIRI, H.; VEINOT, J. G. C.; GOSS, G. G.; Widespread Nanoparticle-Assay Interference: Implications for Nanotoxicity Testing. *Plos One*. v. 9, 2014.

RANKIN, S. Mesenchymal stem cells. *Thorax*. v. 67, p. 565-566, 2012.

ROUXA, S.; LEOTOT, J.; CHEVALLIER, N.; BIERLING, P.; ROUARD, H. Mesenchymal stromal cells: Biological properties and clinical prospects. *Transfusion Clinique et Biologique*. v. 18, p. 1-2, 2011.

SAYES C. M.; REED K. L.; WARHEIT D. B. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing *in vitro* measurements to *in vivo* pulmonary toxicity profiles. *Toxicol Sci.* v. 97, p. 163-18, 2007.

SEO, J.; CHUNG, H.; KIM, M.; LEE, J.; CHOI, I.; CHEON, J. Development of water-soluble single-crystalline TiO₂ nanoparticles for photocatalytic cancer-cell treatment. *Small.* v. 3, n. 5, p. 850-853, 2007.

TSUJI J. S.; MAYNARD A. D.; HOWARD P. C.; JAMES J. T.; LAM C. W.; WARHEIT D. B.; SANTAMARIA A. B. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: risk assessment of nanoparticles. *Toxicol Sci.* v. 89, p. 42-50, 2006.

ZHU, R. R.; WANG, S. L.; CHAO, J.; SHI, D. L.; ZHANG, R.; SUN, X. Y.; YAO, S. D. Bio-effects of nano-TiO₂ on DNA and cellular ultrastructure with different polymorph and size. *Materials Science and Engineering.* v. 29, p. 691-696, 2009.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BEHAIN. P.; HEDRICK, M. H. Tecido adiposo humano é uma fonte de células estaminais multipotentes. *Molecular Biology of the Cell.* v. 13, 4279–4295, 2002.

WADHWA, S.; REA, C.; O'HARE, P.; MATHUR, A.; ROY, S. S.; DUNLOP, P. S. M.; BYRNE, J. A.; BURKE, G.; MEENAN, B.; MCLAUGHLIN, J. A. Comparative *in vitro* cytotoxicity study of carbono nanotubes and titânia nanostructures on human lung epithelial cells. *Journal of Hazardous Materials.* v. 191, p. 56-61, 2011.

WITKOWSKA-ZIMNY, M.; WALENKO, K. Stem cells from adipose tissue. *Cellular e Molecular Biology Letters*, v. 16, n. 2, p. 236-257, 2011.

ZATZ, M.; *Genética: escolhas que nossos avós não faziam*. São Paulo: Globo, 2011.207 p.