

Nanocristais de TiO₂ na fase rutilo-brookita aumentam a migração das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo *in vitro*

Aluna: Cristiane Angélico Duarte

Orientadora: Prof^a Dr^a Vivian Alonso Goulart

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

**Uberlândia – MG
2019**

Nanocristais de TiO_2 na fase rutilo-brookita aumentam a migração das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo *in vitro*

Aluna: Cristiane Angélico Duarte

Orientadora: Prof^a Dr^a Vivian Alonso Goulart

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

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

Uberlândia – MG
2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

D812 Duarte, Cristiane Angélico, 1972-
2019 Nanocristais de TiO₂ na fase rutilo-brookita aumentam a migração das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo in vitro [recurso eletrônico] / Cristiane Angélico Duarte. - 2019.

Orientadora: Vivian Alonso Goulart.
Coorientadora: Luiz Ricardo Goulart.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2431>
Inclui bibliografia.

1. Genética. I. Goulart, Vivian Alonso, 1969-, (Orient.). II. Goulart, Luiz Ricardo, 1962-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

Nanocristais de TiO₂ na fase rutilo-brookita aumentam amigração das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo *in vitro*

Aluna: Cristiane Angélico Duarte

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof^a Dr^a Vivian Alonso Goulart

Examinadores:

Prof. Dr. Victor Arana-Chavez

Prof^a Dr^a Eliana Aparecida de Rezende Duek

Prof^a Dr^a Letícia de Souza Castro Filice

Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva

Data da Defesa: 22 /11/2019

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



Prof^a Dr^a Vivian Alonso Goulart



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica - PPGGB				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico - nº 16/2019 - PPGGB				
Data:	Vinte e dois de novembro de 2019	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	17:00h
Matrícula do Discente:	11523GBI004				
Nome do Discente:	Cristiane Angélico Duarte				
Título do Trabalho:	Bioengenharia utilizando células-tronco mesenquimais e nanocristais de dióxido de titânio para regeneração óssea.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Células tronco e Biotecnologia.				

Aos vinte e dois dias do mês de novembro de dois mil e dezenove, às 14:00 horas no Anfiteatro 4K, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez, Prof^ª. Dr^ª. Eliana Aparecida de Rezende Duek, Prof^ª. Dr^ª. Letícia de Souza Castro Filice, Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva e Prof^ª. Dr^ª. Vivian Alonso Goulart, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, a Prof^ª. Dr^ª. Vivian Alonso Goulart, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato (a):

APROVADO (A).

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram

encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Alonso Goulart, Presidente**, em 22/11/2019, às 17:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Letícia de Souza Castro Filice, Membro de Comissão**, em 22/11/2019, às 17:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudio Vieira da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/11/2019, às 17:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **ELIANA APARECIDA DE REZENDE DUEK, Usuário Externo**, em 22/11/2019, às 17:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Victor Elias Arana Chavez, Usuário Externo**, em 22/11/2019, às 17:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1588248** e o código CRC **5CF4F275**.

*Dedico a minha filha, companheira, amiga e minha
força para continuar esta caminhada chamada vida.*

Agradecimentos

A minha filha Bárbara, que vem suportando minha ausência nesta nossa caminhada conjunta, mas sempre me apoiando e sendo minha razão de vida.

Aos meus pais José Carlos e Maria, por zelarem pela minha educação e por oferecem a mim e aos meus irmãos a oportunidade de crescermos como seres humanos.

Aos meus irmãos, que apesar de distantes, sempre torceram pelo meu sucesso.

Ao meu falecido marido, Aray, que tem grande parte desta etapa da minha vida e que tanta falta fez em momentos difíceis e momentos para compartilhar as alegrias.

À amiga Isabela, minha grande companheira de laboratório, sala de cultura e de todo este doutorado. Obrigada por ter sido este ombro amigo. À Sara que me deu suporte no momento mais decisivo da minha vida. Patrícia, obrigada pelo companheirismo e apoio emocional. Kellen e Esther, amigas e companheiras queridas.

Às professoras Vivian e Letícia, que me concederam a liberdade para que eu pudesse apresentar meu potencial e apontaram o caminho para que eu chegasse aonde cheguei nesse momento.

Ao Prof. Luiz Ricardo minha gratidão pela oportunidade, confiança e todo aprendizado. Aos alunos de pós-doutorado Paula e Mário pelo apoio neste trabalho.

À minha querida aluna Loyna que esteve presente em todos os momentos deste trabalho (feriado, final de semana), toda sorte em sua caminhada de pesquisadora.

Obrigada aos colegas do Laboratório de Nanobiotecnologia, as técnicas Luciana e Natássia por todo o suporte oferecido para o desempenho do meu trabalho.

Aos Professores Doutores Milena Botelho Pereira Soares e Ricardo Ribeiro dos Santos, ambos da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ) de Salvador, pelo suporte nos ensaios *in vitro* as análises de imagens.

A todas as instituições que me receberam durante o doutorado.

Ao Prof. Victor Arana por disponibilizar seu laboratório paraas análises histológicas.

Talvez vocês nunca dimensionem o quanto foram divisores de água na minha caminhada.

Sumário

Agradecimentos	5
Resumo	9
Abstract	11
Lista de Figuras	12
Lista de tabelas	16
Lista de Abreviatura	17
1.INTRODUÇÃO	17
1.1Células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM-TA)	17
1.2 Nanocristais de dióxido de titânio	21
1.3 Metabolômica – Quimiometria	23
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivos gerais	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. METODOLOGIA	24
3.1 <i>Ensaaios in vitro</i>	24
3.1.2 Dopagem com Európio (Eu) dos NCs de TiO ₂	25
3.1.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	26
3.1.4 Dispersão dos NCs de dióxido de titânio (TiO ₂)	27
3.1.5 Análise do DLS (Dynamic Light Scattering)	28
3.1.6 Isolamento e caracterização das CTM-TAs humano pelo método não-enzimático	28
3.1.8 Ensaio de localização dos NCs de TiO ₂ dopados com Eu	30
3.1.10 Metabolômica	31
3.2 <i>Ensaaios in vivo</i>	34
3.2.1 População amostral	34
3.2.2 Grupos Experimentais	34

3.2.4 Tratamentos e coleta de material	35
3.2.5 Análise de fluorescência	35
3.3 Análises Estatísticas	36
4. RESULTADOS	36
4.1 Caracterização dos NCs de TiO ₂ em diferentes combinações de Anatase, Rutilo e Brookita	36
4.2 Marcação luminescente dos NCs de TiO ₂ com Eu	38
4.3 Morfologia e identificação das diferentes fases por Microscopia eletrônica de transmissão	39
4.4 Análise de DLS (Dynamic Light Scattering - Espalhamento Dinâmico de Luz)	42
4.5 Caracterização das células-tronco mesenquimais humana de tecido adiposo	45
4.6 Ensaio da viabilidade celular	48
4.7 Ensaio de internalização dos NCs de TiO ₂ da amostra RB nas CTM-TAs	51
4.8 Ensaio de migração das CTM-TAs tratadas com NCs de TiO ₂	53
4.9 Uso de PCA em dados de Espectrometria de Massas	59
4.10 Análise histológica e análise de fluorescência	68
5 DISCUSSÃO	74
6 CONCLUSÃO	77
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

Resumo

A regeneração de tecidos lesionados do corpo humano tem levado ao desenvolvimento de terapias inovadoras. Dentre elas, as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTM-TAs) e os nanocristais (NCs) biocompatíveis de TiO_2 têm sido considerados estratégias terapêuticas promissoras para a engenharia de tecidos. Os NCs do TiO_2 apresentam várias formas cristalinas que podem afetar a viabilidade das CTM-TAs, e essas combinações não foram anteriormente investigadas. Para demonstrar os efeitos dos NCs de TiO_2 em CTM-TAs *in vitro*, avaliamos diferentes concentrações das amostras de anatase-rutilo (RA), rutilo-anatase (RA) e rutilo-brookita (RB) dopadas com Europium (Eu) em relação a viabilidade, migração celular e localização dos NCs em CTM-TAs. Também foram realizados ensaios *in vivo* com a aplicação de CTM-TAs associadas a TiO_2 na região maxilar de ratos. Foram feitas análises da presença de metabólitos no sobrenadante das CTM-TAs após tratamento com NCs de TiO_2 . Os resultados mostraram que os NCs não foram citotóxicos e permaneceram no citoplasma, sem entrar no núcleo, com aumento significativo da migração celular, apresentando aproximadamente 80% de fechamento da lesão em 24 horas após tratamento das células com 50ug/ml de NCs RB. A análise *in vivo* da intensidade de fluorescência gerada pela presença dos NCs foi estatisticamente maior na maxila quando comparada aos grupos controle e tratamento contendo NCs com sobrenadante CTM-TAs. A maxila e o pulmão não apresentaram alterações histológicas com a aplicação de TiO_2 associados a CTM-TAs. Na análise de quimiometria do sobrenadante da cultura de células-tronco tratadas com NCs de TiO_2 foram encontrados em grande quantidade os metabólitos fosfoenfolipídios subclasse ceramida fosfoetanolamida, que são lipídios estruturais da membrana celular, importantes na sinalização celular, nos processos de regulação do crescimento celular, sobrevivência das células, sistema imune, integridade vascular e epitelial. Resumidamente, a associação de NCs de TiO_2 com CTM-TAs foi aplicada como estratégia de regeneração tecidual, evidenciada pelo aumento da migração celular, sem efeitos de citotoxicidade e devido aos NCs de TiO_2 permanecerem no citoplasma sem migrar para o núcleo, sugere-se que não exista efeitos genotóxicos.

Palavras chaves: células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano, nanocristal de dióxido de titânio, regeneração tecidual, metabólica.

Abstract

The regeneration of injured human body tissues has led to the development of innovative therapies. Among them, mesenchymal adipose-derived stem cells (MSC-ATs) and biocompatible TiO_2 nanocrystals (NCs) have been considered promising therapeutic strategies for tissue engineering. TiO_2 NCs have several crystalline forms that can affect the viability of MSC-ATs, and these combinations have not been previously investigated. To demonstrate the effects of TiO_2 NCs on in vitro MSC-ATs, we evaluated different concentrations of Europium-doped Anatase-rutile (RA), rutile-anatase (RA) and rutile-brookite (RB) samples with respect to viability, cell migration and location of NCs in MSC-ATs. In vivo assays were also performed with the application of TiO_2 - associated MSC-ATs in the rat maxillary region. Analyzes of the presence of metabolites in the MSC-ATs supernatant were performed after treatment with TiO_2 NCs. The results showed that the NCs were not cytotoxic and remained in the cytoplasm without entering the nucleus, with significant increase in cell migration, presenting approximately 80% of lesion closure within 24 hours after treatment with 50ug / ml RB NCs. The in vivo analysis of fluorescence intensity generated by the presence of NCs was statistically higher in the maxilla when compared to control and treatment groups containing NCs with MSC-ATs supernatant. The maxilla and lung showed no histological changes with the application of TiO_2 associated with MSC-ATs. In the chemometrics analysis of the supernatant of the stem cell culture treated with TiO_2 NCs, phosphoenphingolipids subclass ceramide phosphoethanolamide metabolites, which are cell membrane structural lipids, important in cell signaling, cell growth regulation processes, were found. cell survival, immune system, vascular and epithelial integrity. Briefly, the association of TiO_2 NCs with MSC-ATs was applied as a tissue regeneration strategy, evidenced by the increase of cell migration, without cytotoxicity effects and due to TiO_2 NCs they remained in the cytoplasm without migrating to the nucleus. there are genotoxic effects.

Keywords: adipose mesenchymal stem cells, titanium dioxide nanocrystals, tissue regeneration, metabolomic.

Lista de Figuras

- Figura 1** Células unitárias das modificações do TiO_2 rutilo, brookita e anatase (da esquerda para a direita).
- Figura 2** Caracterização de TiO_2 e de NCs de TiO_2 dopado com Eu. Padrões de XRD de NCs de TiO_2 nas diferentes temperaturas e tempos (100°C / 24h, 500°C / 1h, 650°C / 1h e 800°C / 1h).
- Figura 3** (A) Padrão de XRD da amostra de NCs de RB dopados com Eu. (B) Espectro Raman dos NCs da amostra RB dopados com Eu. (C) NCs sob luz ultravioleta e visível.
- Figura 4** A) Amostra A : (a) região com NCs de anatase de distribuição de tamanho homogêneo, (b) Região com distribuição de tamanho heterogêneo, (c) Padrão de difração de elétrons da anatase pouco definido. B) Amostra AR: (a) NCs da anatase de tamanho homogêneo, (b) Área com NCs em maior magnificação, (c) padrão de difração de elétrons típico da estrutura da anatase. C) Amostra RA: (a) Pequeno aglomerado contendo NCs de anatase e de rutilo, (b) Imagem com maior magnificação identificando as partículas de anatase (partículas menores), A e as partículas de rutilo, R, (partículas maiores), (c) padrão de difração de elétrons indica com anéis correspondentes às estruturas de anatase (A) e rutilo (R). D) Amostra RB: (a) pequeno aglomerado de NCs de tamanho homogêneo, (b) Imagem dos NCs em maior magnificação, (c) Padrão de difração de elétrons contendo anéis.
- Figura 5** Tamanho dos aglomerados de NCs de TiO_2 das 4 amostras quando sonicadas em DI e em meio completo.
- Figura 6** Diferença estatística do índice de polidispersão (Pdl) dos NCs em diferentes meios.

- Figura 7** Morfologia das CTM-TA em segunda passagem: aderente e morfologia fibroblastóide. Fotografia obtida através de microscopia eletrônica nos aumentos de 10x (A) e 4x (B), respectivamente.
- Figura 8** Análise dos marcadores positivos e negativos da população de CTM-TA por citometria de fluxo.
- Figura 9** A) Diferenciação das CTM-TA na linhagem adipogênica observando gotículas de lipídios coradas com Oil-Red; B) Linhagem osteogênica onde observa depósitos de cálcio corado com vermelho de Alizarina; e C) Presença de matriz de glicosaminoglicanos coradas com Alcian Blue na diferenciação condrogênica.
- Figura 10** Viabilidade das CTM-TAs após tratamento com NCS de TiO_2 da mesma amostra e em diferentes concentrações: A) Anatase, B) Anatase-Rutilo, C) Rutilo-Anatase e D) Rutilo-Brookita.
- Figura 11** Imagem das CTM-TA com o tratamento dos NCs de TiO_2 , quanto à viabilidade celular: A) amostras A (anatase); B) AR (anatase/rutilo); C) amostras RA (rutilo/anatase) e D) RB (rutilo/brookita). Linhas 1: campo branco; 2: sobreposição de campo branco e fluorescência; 3: fluorescência.
- Figura 12** A) Imagens feitas com microscópio Confocal após 24 horas de tratamento das CTM-TA com NCs de TiO_2 da amostra RB, nas concentrações 5, 50, 100 e 250 μg (aumento de 40x); B) Quantificação dos NCs de TiO_2 após tratamento de 24h em CTM-TAs (Programa ImageJ).
- Figura 13** Análise de migração das CTM-TAs após 24h de tratamento com as amostras A (anatase), AR (anatase-rutilo), RA (rutilo-anatase) e RB (rutilo-brookita), onde mostra que na amostra RB com concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ houve maior fechamento da ferida. (ANOVA-Turkey: **p = 0,05; *p < 0,05).
- Figura 14** Imagem feita em microscópio óptico do ensaio de migração demonstrando o fechamento da ferida no ensaio de migração celular das CTMs tratadas com NCs de TiO_2 com as amostras A, AR, RA e RB nas concentrações 50, 100, 150 e 200 μg .

- Figura 15** Análise de PC's comparando no modo positivo das A, AR, RA e RB com o Controle: A) Separação total da amostra A em relação ao controle; B) Separação da amostra AR em relação ao controle; C) Não ocorreu a separação da amostra RA em relação ao controle; e D) Não ocorreu a separação da amostra RB em relação ao controle.
- Figura 16** Quimiometria nos modelos A3 e A4: Presença em maior porcentagem dos compostos 437, 706 e 202.
- Figura 17** Modelo de PCA's para modo negativo construídos usando a distância euclidiana, o mean center como pré-processamento e o Ward's Method como método de ligação. Separação das amostras: A) amostra A x controle; B) amostra AR x controle ;C) amostra RB x controle.
- Figura 18** Análise Quimiométrica com a não separação entre a amostra RA e controle.
- Figura 19** Análise Quimiométrica: demonstração da menor distância entre as amostras A (modelo A4) e AR (modelo A3).
- Figura 20** Presença do metabólito com 339 para os modelos A3 (amostra AR) e A4 (amostra A) de NCs de TiO₂ aplicados à CTM-TAs, com uma contribuição de 35% e 22,5%, respectivamente.
- Figura 21** Análise da intensidade de fluorescência nos diferentes órgãos dos ratos após aplicação de CTM-TAs e/ou NCs da amostra RB dopados com Európio na concentração de 50µg/ml. A) Intensidade de Fluorescência obtida na Maxila de ratos; B) Intensidade de Fluorescência obtida no Fígado; C) Intensidade de Fluorescência obtida no Pulmão; D) Intensidade de Fluorescência obtida no rim.
- Figura 22** Imagens da intensidade de fluorescência nos diferentes órgãos dos ratos após aplicação de CTM-TAs e/ou NCs da amostra RB dopados com Európio na concentração de 50µg/ml. A) Maxila; B) Fígado; C) Pulmão; D) rim.
- Figura 23** Cortes histológicos próximo das fossas nasais dos ratos nos diferentes tratamentos onde não foi verificada alteração entre os grupos. Grupo I:

controle; Grupo II: células-tronco mesenquimais associadas a 50µg/mL de NCs da amostra RB; Grupo III: 50µg/ml de NCs da amostra RB diluída em PBS; Grupo IV: sobrenadante das células-tronco mesenquimais associadas a 50µg/mL de NCs da amostra RB. Grupo V: sem tratamento.

Figura 24 Avaliação histológica de alvéolo, artéria pulmonar e bronquíolos dos grupos: Grupo I: controle; Grupo II: células-tronco mesenquimais associadas a 50µg/mL de NCs da amostra RB; Grupo III: 50µg/ml de NCs da amostra RB diluída em PBS; Grupo IV: sobrenadante das células-tronco mesenquimais associadas a 50µg/mL de NCs da amostra RB. Grupo V: sem tratamento.

Lista de tabelas

- Tabela 1** Comparação de células-tronco mesenquimais (CTMs) de diferentes fontes com referência a diferentes parâmetros: CTM derivadas de medula óssea, CTM derivadas de tecido adiposo, CTMs derivadas de cordão umbilical, células-tronco de polpa dentária e CTMs endometriais.
- Tabela 2** Características de cada amostra quanto a temperatura, tamanho/diâmetro e composição. A: anatase, AR: anatase e rutilo, RA: rutilo e anatase e RB: rutilo e brookita.
- Tabela 3** Matriz da análise realizada.
- Tabela 4** Combinação para os modelos PCA e HCA.
- Tabela 5** Valores médios do tamanho do aglomerado dos NCs de TiO_2 analisados por DLS, após sonicação em água ultrapura e em DMEM+SFB 10%+ BSA nas amostras A, AR, RA e RB.
- Tabela 6** Valores do Pdl nas 4 amostras de NCs em DI e meio completo. A: anatase, AR: anatase/rutilo; RA: rutilo/anatase e RB: rutilo/brookita.

Lista de Abreviatura

A- Anatase

AR-Anatase-Rutilo

BSA - Soro Albumina Bovina

Ca²⁺ - Cálcio

CaPO₄- Fosfato de cálcio

CEUA- Comissão de Ética na Utilização de Animais

CGA - Células germinativas embrionárias

CTA - Células-tronco adultas

CTE - Células-tronco embrionárias

CTMs- Células-tronco mesenquimais

CTM-TA - Células-tronco mesenquimais de tecido adiposo

DI – Água Deionizada

DLS- Dynamic Light. Scattering

DMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium

DTP - Distribuição de tamanho de partícula

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

IES/EM - Espectrometria de Massas com ionização de eletrospray

Eu - Európio

F- Fluoreto

HCA - Análise de cluster hierárquico

HNO₃- Ácido nítrico

H₃O⁺- Íon Hidrônio

IP- Iodado de Propídio

LNMIS - Laboratório de Novos Materiais e Semicondutores

MEC - Matriz extracelular

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

Na⁺ - Sódio

NaOH- Hidróxido de sódio

NCs– Nanocristais

NiTi - Níquel e Titânio

nm - Nanômetro

NPs- Nanopartículas

O - Oxigênio

PBS- Solução tampão fosfato (phosphate buffer solution)

PCA - Análise dos componentes principais

PdI - Índice de polidispersão

PO₄⁻ - Fosfato

RA – Rutilo-Anatase

RB – Rutilo-Brookita

REBIR/UFU - Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia

ROI - Automatic region of interest

SFB – Soro Fetal Bovino

SITC - Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e Teciduais da Sociedade Internacional de Terapia Celular

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Ti - Titânio

TiO₂ – Dióxido de titânio

Ti (OCH (CH₃)₂) - Isopropoxido de titânio

Ti-OH - Hidróxido de titânio

1.INTRODUÇÃO

A regeneração tecidual é um tratamento cujo principal objetivo é reconstituir tecidos na área traumatizada, e a engenharia tecidual permite recriar, o mais próximo da realidade possível, órgãos, tecidos ou sistemas, assim compõe uma área de pesquisa com uma grande importância, que consiste na utilização de biomateriais, como matrizes para dar suporte a culturas de células de maneira a desenvolver tecidos vivos [1].

Materiais que induzem regeneração necessitam de alguns requisitos básicos, como por exemplo: boa bioatividade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e uma baixa imunogenicidade [2, 3]. Entender o comportamento dos nanocristais de dióxido de titânio é fundamental para sua aplicação na engenharia tecidual.

As células-tronco mesenquimais possuem características que as tornam atraentes para terapia celular. Isto porque são facilmente obtidas, apresentam baixa expressão de antígenos de histocompatibilidade, secretam fatores de crescimento e outras citocinas importantes no papel da proliferação celular e indução da angiogênese [4].

1.1 Células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM-TA)

O conceito de célula-tronco surgiu a partir de experimentos pioneiros realizados no início dos anos 1960 por Ernest A. McCulloch e James E. Till que observaram a presença de colônias hematopoiéticas no baço de camundongos irradiados e que haviam recebido transplante de medula. Essas colônias eram derivadas de uma única célula, a célula-tronco [5]. Alexander Friedenstein demonstrou a capacidade das células-tronco de autorrenovação e diferenciação [6] e inicialmente foram denominadas unidades formadoras de colônias fibroblástica, pois sua morfologia era semelhante ao de fibroblastos [7].

As células-tronco são capazes de autorrenovação através de sucessivas divisões mitóticas do tipo assimétrica, passíveis de originar pelo menos um tipo celular em estágio

mais avançado de diferenciação [8]. Dependendo do seu local de origem elas podem ser divididas em dois grupos: embrionárias, quando são derivadas da massa celular interna do blastocisto de embriões; e adultas, que são aquelas localizadas em estado mais diferenciado na maioria dos tecidos do organismo adulto[9].

As células-tronco embrionárias (CTE) correspondem às células da massa celular interna do embrião na fase de blastocisto (amplo potencial de diferenciação), e células germinativas embrionárias (CGE), obtidas do tecido fetal em um estágio mais avançado de desenvolvimento (da espinha gonadal). As CTE tem a capacidade de formar as células dos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma) [10]. Já as CGEs são capazes de formar as três camadas germinativas que compõem todos os órgãos do corpo humano, embora seu potencial seja mais limitado se comparado com as CTEs, pois se encontram em um estágio mais avançado de desenvolvimento [11]. As células-tronco adultas (CTA) são populações celulares indiferenciadas mantidas no organismo adulto e podem ser encontradas em vários órgãos e tecidos [12]. As primeiras CTA estudadas e as mais bem caracterizadas são as células-tronco hematopoiéticas provenientes da medula óssea. Estudos demonstraram que essas células possuem a capacidade de se diferenciar em linhagens celulares mesodérmicas, incluindo condrócitos, osteoblastos, adipócitos e mioblastos [13], sendo o ponto chave da formação e reparação óssea e restabelecem a função esquelética produzindo efeitos parácrinos e autócrinos[14].

Devido ao grau de plasticidade da célula-tronco, ou seja, o seu potencial de diferenciação em tecidos variados, elas se classificam em quatro tipos principais: totipotentes, pluripotentes, multipotentes e onipotentes [12, 15]. As células-tronco totipotentes podem originar tanto um organismo totalmente funcional, como qualquer tipo celular do corpo, inclusive todo o sistema nervoso central e periférico, que correspondem às células do blastocisto [16]. As multipotentes estão presentes no indivíduo adulto, com capacidade de originar apenas um limitado número de tipos teciduais. Estas células são designadas de acordo com o órgão do qual derivam. Numerosas pesquisas estabeleceram que essa célula-tronco específica pode se diferenciar em diferentes tecidos, como osso, músculo, cartilagem, gordura e outros tecidos relacionados. As CTMs atuam como uma importante chave no processo de desenvolvimento, cicatrização de tecidos e defesa. Recentemente, a aplicação de células-tronco para o tratamento de

numerosos transtornos, como distúrbios neurais e cardíacos, tornou-se um assunto familiar com enorme garantia no futuro das ciências médicas [15]. As pluripotentes são capazes de originar qualquer tipo de tecido sem originar um organismo completo [16, 17], e as células-tronco unipotentes, são definidas como células que têm a competência de diferenciar em apenas uma linhagem [18].

O tecido adiposo representa uma fonte abundante de células-tronco mesenquimais para transplantes autólogos. Comparando as células-tronco da medula óssea, do cordão umbilical e do tecido adiposo verificou-se que não apresentam diferenças quanto à morfologia e ao fenótipo imunológico [19]. Assim como a medula óssea, o tecido adiposo é derivado do mesoderma embrionário e contém um estroma que é facilmente isolado, contendo uma população heterogênea de células-tronco. Além da possibilidade de obtenção de grande quantidade de material, a concentração de células-tronco no tecido adiposo pode ser, proporcionalmente, até 500 vezes maior do que a encontrada na medula óssea segundo alguns autores [20]. As células-tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo podem ser denominadas células estromais derivadas do tecido adiposo, nomenclatura definida como a mais adequada na “*Second Annual International Fat Applied Technology Society Meeting*” [21].

Em um estudo comparativo foi demonstrado que as funções imunomoduladoras da CTM de tecido adiposo são semelhantes às da medula óssea e apresentaram maior capacidade angiogênica [22]{Robey, 2000 #32}. Além disso, verificou-se que as CTM-TA possuem parâmetros melhores que a CTM de medula óssea, como disponibilidade do tecido, área da célula e uniformidade da morfologia celular, conforme tabela abaixo [23].

Tabela 1- Comparação de células-tronco mesenquimais (CTMs) de diferentes fontes com referência a diferentes parâmetros: CTM derivadas de medula óssea (CTM-MO), CTM derivadas de tecido adiposo (CTM-TA), CTM derivadas de cordão umbilical (CTM-UC), células-tronco de polpa dentária(CTM-DP) e CTM endometriais (eCTM) [42].

	CTM-MO	CTM-TA	CTM-UC	CTM-DP	ECTM
DISPONIBILIDADE DE TECIDO	YY	YYY	YYY	Y	YYY
RENDIMENTO CELULAR	Y	YY	YY	YY	YY
UNIFORMIDADE DA FORMA DA CÉLULA	Y	YY	YYY	YY	YYY
PROLIFERAÇÃO	YY	YY	YYY	YYY	YYY
SENESCÊNCIA IN VITRO	YYY	YY	Y	YY	Y
CAPACIDADE DE DIFERENCIAÇÃO	YYY	YYY	YY	YY	YY
FUNÇÃO DO ESTROMA	YYY	YYY	Y	Y	YY
USO AUTÓLOGO	YYY	YYY	Y	Y	YY
USO ALOGÊNICO	YYY	YYY	YYY	YYY	YYY

Y baixo, YY médio, YYY alto

Com o aumento na utilização das células-tronco mesenquimais (CTM) de tecido adiposo e a ausência na uniformidade para sua caracterização, o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e Teciduais da Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) propôs critérios mínimos para caracterizar as CTM humanas, que devem [24]:

1) serem “aderentes ao plástico” (aderentes ao substrato), quando mantidas em condições padrão de cultivo *in vitro*;

2) expressar os marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90, e não expressar os marcadores hematopoiéticos CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79α ou CD19, e HLA-DR e;

3) diferenciar *in vitro* em linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas [25].

O interesse pelas células-tronco mesenquimais de tecido adiposo tem aumentado muito na medicina, principalmente em função da facilidade de obter grandes quantidades destas células pelo processo de lipoaspiração. O tecido adiposo humano está presente em muitas regiões do corpo, podendo realizar a sua coleta sob anestesia local, causando pouco desconforto para o paciente. Assim, o tecido adiposo se configura como fonte alternativa de CTM para a regeneração de tecidos e para a engenharia de tecidos [26].

A utilização de células-tronco apresenta uma série de vantagens, como a sua capacidade de autorreplicação ou de produção de novas células desempenhando um papel significativo na regeneração tecidual após lesão.

Na cultura de células-tronco, as interações micro/nanoescala com componentes da matriz extracelular (MEC) constituem outra fonte de forças mecânicas passivas que podem influenciar os comportamentos das células-tronco. Para melhor imitar a nanoestrutura da MEC natural, na última década, os *scaffolds* fabricados a partir de nanofibras, nanotubos, nanopartículas e hidrogel surgiram como candidatos promissores para produção de suportes que se assemelham à MEC e substituem eficientemente tecidos defeituosos. As características biomiméticas e as excelentes propriedades físico-químicas dos nanomateriais desempenham um papel fundamental na estimulação do crescimento celular, bem como da regeneração tecidual[27].

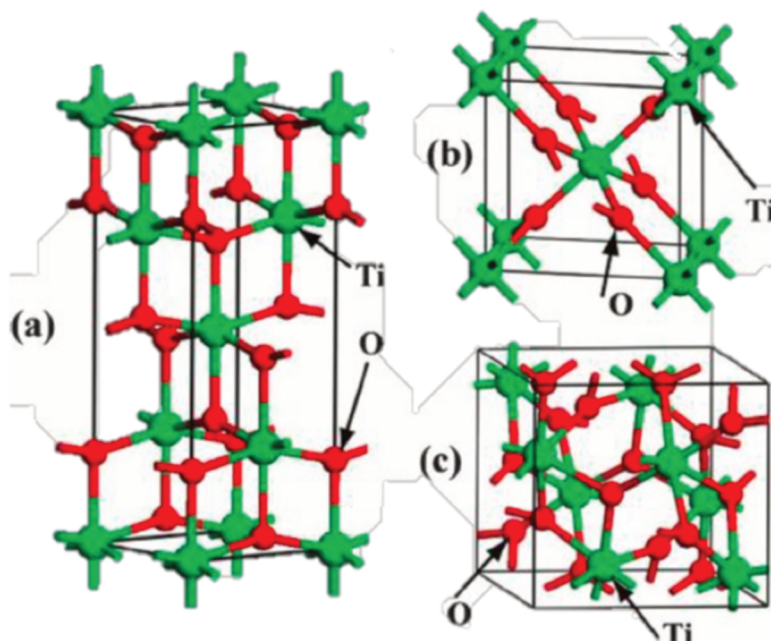
1.2 Nanocristais de dióxido de titânio

As aplicações da nanotecnologia nas áreas biomédicas é uma realidade. As propriedades de nanomateriais e nanotecnologia para a sua implementação e difusão nas áreas de biomedicina, eletrônica e mecânica nos permitem vislumbrar uma realidade promissora em áreas interdisciplinares da química, física, biologia e medicina [28].

Desde que os estudos em bioengenharia tecidual iniciaram, vários foram os trabalhos que surgiram com o uso de biomaterias e células na indução da diferenciação osteogênica. A fim de melhorar consideravelmente a regeneração e reparo ósseo, há uma alta procura por nanopartículas osteogênicas mais eficazes [29]. Como exemplo de nanopartícula, o óxido de titânio (TiO_2) aumenta a adesão de células precursoras ósseas e, portanto, pode acelerar a neoformação de osso [30].

O TiO_2 possui três estruturas cristalinas de equilíbrio: rutilo, anatase e brookita. A célula unitária do rutilo e da anatase é tetragonal e a estrutura não é de empacotamento compacto. No rutilo cada átomo de titânio está coordenado por seis átomos de oxigênio nos vértices de um octaedro (ligeiramente distorcido) e cada átomo de oxigênio está rodeado por três átomos de titânio, dispostos em forma planar, situados nos vértices de um triângulo (quase) equilátero. As fases anatase e rutilo são de estrutura tetragonal e a brookita, ortorrômbica [31]. (Figura 1)

Figura 1 - Estrutura cristalina do TiO_2 , (a) Anatase, (b) Rutilo e (c) Brookita[32]



Descobriu-se que a morfologia do TiO_2 formada é drasticamente alterada mediante as várias condições eletroquímicas. Essas diferentes morfologias podem resultar ainda em uma reação competitiva entre os íons que compõe o eletrólito e que fornece os diferentes níveis de incorporações de ânions no óxido de titânio, formando, por exemplo: eletrólito contendo íon F^- (fluoreto) e PO_4^- (fosfato). OTiO_2 contendo íons F^- , estimula a adesão celular, enquanto a alta proliferação dos níveis celulares é observada em TiO_2 onde é incorporado o fosfato [33].

A utilização de nanocristais de TiO_2 associadas as CTM-TA pode auxiliar nos estudos relacionados a medicina regenerativa, pois de acordo com Textor et al (2001), há uma nova perspectiva para a avaliação da biocompatibilidade de nanomateriais envolvendo a aplicação de CTMs, especialmente por sua utilização terapêutica para melhorar os processos de regeneração de tecidos[34].

As nanopartículas de TiO_2 são conhecidas como um material biocompatível, bioativo, osteogênico e fotoestável [35, 36]. Porém, há a preocupação com a potencial de toxicidade das NPs (nanopartículas) em geral e, particularmente de TiO_2 , após estudos que demonstraram que a inflamação pulmonar aumenta quando há retenção de partículas ultrafinas de TiO_2 (que equivalem às NPs devido ao tamanho) [37].

As características da migração são influenciadas pela estimulação externa e interna [38], por isso o meio em que as células são cultivadas podem determinar um aumento da migração acelerando, por exemplo, um reparo tecidual. Foi verificado que NPs de óxido nítrico acelera a cicatrização de feridas pois aumentava a migração de fibroblastos e a deposição de colágeno no tecido da ferida [39].

Além disso, pouco se conhece a respeito da internalização celular dos NCs anatase, rutilo e brookita e suas diferentes combinações, bem como seu efeito em processos biológicos como a migração das CTM-TA *in vitro* e *in vivo*. O avanço no conhecimento sobre os aspectos físico-químicos das nanopartículas, em especial os nanocristais de dióxido de titânio, bem como na interação e no comportamento com as células-tronco mesenquimais de tecido adiposo poderão resultar em aplicações práticas que auxiliem nos processos de regeneração tecidual.

1.3 Metabolômica – Quimiometria

Em estudos metabolômicos, é frequente o uso de material amostral de alta complexidade química, a exemplo do observado em extratos de tecidos vegetais e animais, de micro-organismos e biofluidos. Os métodos de análise multivariada normalmente utilizados na quimiometria incluem a análise dos componentes principais (PCA) e a análise de agrupamentos hierárquicos (AH) [40].

O objetivo da PCA é descrever a variância de um conjunto de dados multivariados em termos de um conjunto de variáveis ortogonais subjacentes, denominadas CPs. Uma PCA faz com que seja possível fornecer um resumo de todas as observações ou amostras obtidas em uma tabela de dados [41].

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar *in vitro* o comportamento e metabólômica das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo quando tratadas com NCs de TiO₂ e *in vivo* a sua localização em diferentes órgãos.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar a citotoxicidade de nanocristais de dióxido de titânio em CTM-TA com as diferentes fases cristalinas: Anatase-A (100%), Anatase/Rutila-AR (91,6%/8,4%), Rutila/Anatase-RA (64,56%/35,44%) e Rutila/Brookita-RB (84,07%/15,93%) nas concentrações de 5, 50, 100 e 200 µg;
- 2) Avaliar a localização dos Nanocristais de TiO₂ nas CTM-TA após 24 horas de tratamento;
- 3) Avaliar o tamanho e o índice de polidispersão dos NCs de TiO₂;
- 4) Avaliar a migração celular no tratamento das CTM-TA com as diferentes amostras (A, AR, RA e RB) e concentrações (5, 50, 100 e 200 µg) utilizando ensaios de ferida na monocamada celular;
- 5) Analisar a metabólômica do sobrenadante das CTM-TA após tratamento com os Nanocristais de TiO₂;
- 6) Analisar a localização de CTM-TA associadas aos NCs de TiO₂ na maxila, pulmão, rim e fígado de ratos.

3. METODOLOGIA

3.1 Ensaios *in vitro*

3.1.1 Síntese e caracterização dos NCs de TiO₂

Todos os NCs de TiO₂ dopados com Európio foram sintetizados e caracterizados no Laboratório de Novos Materiais e Semicondutores (LNMIS), Instituto de Física, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

Os NCs de TiO₂ foram sintetizados por solução aquosa em diferentes temperaturas. Inicialmente, foi preparada uma solução contendo 300 ml de água

ultrapura e 60 ml de ácido nítrico (HNO₃, 70%, Sigma Aldrich), sob agitação magnética durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 60 ml de isopropóxido de titânio (Ti (OCH (CH₃)₂)₄, 97%, Sigma-Aldrich). O pH da solução foi ajustado para 5,6 utilizando uma solução 4 M de hidróxido de sódio (NaOH 98%, Sigma-Aldrich) e adicionou-se a 400 ml de água ultrapura, mantendo sob agitação magnética durante 30 minutos. A solução resultante foi mantida em repouso para ocorrer o processo de precipitação dos NCs de TiO₂. O precipitado foi monodisperso em água ultrapura sob agitação magnética e centrifugado a 6000 rpm/10 minutos. Finalmente, o precipitado foi purificado e submetido ao seguinte recozimento sucessivo térmico na atmosfera ambiente: (i) 100 ° C / 24h (amostra A – anatase), 500 ° C / 1h (amostra AR – anatase e rutilo), 650 ° C / 1h (amostra RA – rutilo e anatase e 800 ° C / 1h (amostra RB – rutilo e brookita), como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Características de cada amostra quanto a temperatura, tamanho/diâmetro e composição.

	TEMPERATURA	TAMANHOS/DIÂMETRO	COMPOSIÇÃO
Amostra A	100°C	4,4 nm	100% anatase
Amostra AR	500°C	8,5 nm	91,6% anatase e 8,4% rutilo
Amostra RA	650°C	32 nm	64,56% rutilo e 35,44% anatase
Amostra RB	800°C	44,1 nm	84,07% rutilo e 15,93% brookita

A: anatase, AR: anatase e rutilo, RA: rutilo e anatase e RB: rutilo e brookita

3.1.2 Dopagem com Európio (Eu) dos NCs de TiO₂

Para realização de análises de localização *in vitro* e *in vivo*, os NCs forma dopados com Európio (Eu), que é uma molécula luminescente e de fácil visualização. Eu é um elemento químico de número atômico 63, tem recebido bastante atenção devido às suas propriedades luminescentes. Os NCs de TiO₂ dopados com Eu foram sintetizados em solução aquosa à temperatura ambiente, como se segue: uma solução contendo 300 mL

de água ultrapura, soluções aquosas de 30 mL de ácido nítrico (HNO_3 , 70%, Sigma Aldrich) e cloreto de európio (Eu^{+3}) (EuCl_3 , 99,999%, Sigma Aldrich) de 5% em peso de Ti (titânio). Em seguida, foi submetido a agitação magnética durante 20 minutos e depois foi adicionado a 60 mL de isopropóxido de titânio ($\text{Ti}(\text{OCH}(\text{CH}_3)_2)_4$, 97%, Sigma Aldrich). A solução resultante foi deixada em repouso para precipitar os NCs de TiO_2 . O precipitado foi monodisperso em água ultrapura sob agitação magnética e centrifugado a 6.000 rpm, durante 1 minuto. Finalmente, o precipitado resultante foi submetido aos seguintes tratamentos térmicos sucessivos na atmosfera ambiente: (i) $100^\circ\text{C}/24\text{h}$ (amostra A – anatase), $500^\circ\text{C}/1\text{h}$ (amostra AR – anatase e rutilo), $650^\circ\text{C}/1\text{h}$ (amostra RA – rutilo e anatase e $800^\circ\text{C}/1\text{h}$ (amostra RB – rutilo e brookita). A difração de raios-X (XRD) foi registrada com um DRX-6000 (Shimadzu) usando radiação monocromática $\text{Cu-K}\alpha 1$ ($\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$) para confirmar a formação de NCs de TiO_2 , bem como a estrutura de cristal, tamanho e média da fração em massa da fase rutilo. O tamanho dos NCs foi estimado com base na equação de Debye-Scherrer[42]. Os padrões XRD das amostras tratadas a $100^\circ\text{C} / 24 \text{ h}$, $500^\circ\text{C} / 1 \text{ h}$ e $650^\circ\text{C} / 1 \text{ h}$ usaram o pico de difração (101) de Bragg da fase anatase localizada em aproximadamente $2\theta = 25,4^\circ$, e as amostras tratadas a $800^\circ\text{C} / 1 \text{ h}$ foi usado o pico (110) da fase de rutilo localizada em aproximadamente $2\theta = 27,8^\circ$. A porcentagem de fases anatase, brookita e rutilo foi calculada com base na literatura[43]. O espectro Raman foi gravado com um espectrômetro LabRAM HR Evolution (HORIBA) usando um laser de 633 nm à temperatura ambiente.

3.1.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As amostras dos NCs foram diluídas em DI (água deionizada). Após a sonicação elas foram deixadas em repouso por 3 horas e depois retirado o sobrenadante mais superficial, pois são considerados os NCs mais estáveis e com menos peso. As suspensões de cada amostra foram aplicadas em grades de cobre com filme de carbono (Lacey carbon Cu 300 mesh).

Para observar a morfologia, o tamanho dos NCs e dos aglomerados de TiO_2 foi realizada microscopia eletrônica de transmissão (microscópio modelo Tecnai G2

SpiritTwin da FEI com filamento de LaB6 hexaboreto de Lantânio). As imagens foram obtidas a 120 kV e foram usados os modos campo claro, campo escuro e multifeixe. Obteve-se imagens do padrão de difração de elétrons para estudo das diferentes fases presentes nas amostras. Para a indexação e a análise dos padrões de difração de elétrons foi utilizado o *software MacTempas*.

3.1.4 Dispersão dos NCs de dióxido de titânio (TiO₂)

A dispersão dos NCs foi preparada utilizando uma solução estoque de NCs das fases 1 e 2 em água ultrapura a uma concentração de 2 mg/mL (pH 4). Após este procedimento, um desintegrador ultra-sônico (Q-Sonica 700 W, EUA) equipado com uma ponta de 19 mm de Ti foi usado para dispersar os NCs. Para reduzir um aumento de temperatura das amostras, um banho de gelo foi utilizado durante o processo de sonicação direta. A sonicação foi então realizada a 32 W de potência acústica durante 15 minutos, com um pulso de 8 segundos de duração *ON* e um *OFF* de 2 segundos em banho de gelo, com 50% de amplitude. O preparo dos NCs das amostras A e AR em meio de cultura de células foi realizado por diluição da solução estoque de 2 mg/mL em DMEM (Gibco™, Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) suplementado com SFB (soro fetal bovino) a 10% (v/v), pH 7 nas concentrações de 5µg/mL, 50µg/mL, 100 µg/mL e 250µg/mL. Devido ao aumento da agregação dos NCs em meio de cultura, o soro albumina bovina (BSA) foi utilizado como agente estabilizador. Para isso, adicionou-se 100 µg/ml de BSA ao meio DMEM com SFB a 10%[12].

Inicialmente o preparo dos NCs das amostras RA e RB foram em água ultrapura em uma concentração de 10mg/mL. A sonicação foi realizada por 10 minutos, com um pulso de 8 segundos de duração *ON* e um *OFF* de 2 segundos em banho de gelo e com amplitude de 30%. E para os testes em meio de cultura foi realizado o mesmo preparo que as amostra A e AR, ou seja, nas concentrações 5, 50, 100 e 250µg/mL.

3.1.5 Análise do DLS (Dynamic Light Scattering)

DLS é amplamente utilizado para a determinação *in situ* do tamanho médio de partícula ou DTP (distribuição de tamanho de partícula) dos NCs em suspensão preparados em diferentes tipos de meios[44].

As medidas DLS foram realizadas usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Inc., MA, EUA), operando em modo de retrocesso com um ângulo de dispersão de 173°. As amostras sonicadas em água deionizada (DI) foram analisadas em cubetas de poliestireno com 1 mL de volume total, para atingir um nível de dispersão de luz apropriado. Para cada amostra, as medidas foram realizadas em triplicata, com a mesma duração de tempo para cada análise, que foi determinada automaticamente pelo software Zetasizer.

Também foram medidos os aglomerados dos NCs em meio de cultura completo (DMEM + SFB 10%) com BSA. Foram colocadas em cubetas 1 mL de cada amostra, também em triplicata.

3.1.6 Isolamento e caracterização das CTM-TAs humano pelo método não-enzimático

As CTM-TAs foram isoladas de lipoaspirado de pacientes que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), de acordo com a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética (nº 1.776.680).

O material coletado foi levado ao Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, deixado em repouso por 1 hora para que o material decantasse, separando na parte inferior o sangue e na parte superior a gordura resultante da ruptura das células adiposas. Em seguida foram retirados 15 ml de tecido adiposo (parte do meio), acrescentado 15ml de soro fetal bovino (Cultilab), e centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação foi feita a mesma separação, descartando a parte inferior da parte superior, e recolhendo somente o tecido adiposo. Após a terceira centrifugação, foram coletados fragmentos do tecido adiposo e o mesmo colocado nos cantos das garrafas pequenas de cultura (25cm²) e cobertos com cerca de

2,5ml de soro fetal bovino em cada fragmento. Depois de 24hs, foi adicionado Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM - Cultilab) baixa glicose com 20% de SFB. As células foram mantidas numa incubadora umidificada a 37°C com 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada dois dias até que as células atingissem 80-90% de confluência.

O Comitê de Células-Tronco Tecidual e Mesenquimal da Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISTC) propôs marcadores fenotípicos para caracterizar CTM-TA humano[24].

As células aderentes foram destacadas com tripsina a 0,25% / EDTA, centrifugadas por 5 min a 1.200 × g e ressuspensas em PBS. Alíquotas contendo 1 x 10⁶ de células foram incubadas com anticorpos monoclonais primários, sendo eles: positivos: CD 73 (APC), CD 105 (AF 488), CD 90 (PE/CY7), CD 29 (AF488), CD 13 (APC), CD 44 (PE/CY7) e negativos: CD 31 (AF 488) E CD 45 (APC). E também com BD™ CompBeads Controle Negativo e 1 gota BD™ Comp Beads Anti-Mouse IgG, de acordo com o Comitê de Células-Tronco Tecidual e Mesenquimal da Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISTC) [24].

As amostras foram analisadas usando um FACScan (BD Immunocytometry Systems, EUA) e os resultados foram adquiridos utilizando o software FlowJo.

Para haver a confirmação que as células cultivadas pertenciam a linhagem de células-tronco mesenquimais, ao final da terceira passagem foi induzida a diferenciação de uma porção celular para a linhagem osteogênica, condrogênica e adipogênica. As células foram depositas em placas de seis poços e cultivadas em estufa umidificada a 37 °C e 5 % CO₂. O meio de cultivo era trocado a cada três dias e após 21 dias de cultivo. Para a diferenciação osteogênica as células foram coradas com Alizarin Red S (Alfa Aesar, Reino Unido) o qual cora a matriz mineralizada em vermelho, para adipogênica, foram coradas com Oil-red O (Sigma- Aldrich, Reino Unido) o qual cora as gotículas de gordura em vermelho. Já para a diferenciação condrogênica as células coradas com Alcian Blue o qual cora os proteoglicanos em azul.

3.1.7 Ensaio de viabilidade celular utilizando Hoechst 33342 e IP (Iodeto de Propídio)

Após a confluência de 80-90%, as CTM-TA foram tripsinizadas (Tryple® Gibco®, New York, USA), semeadas em microplacas de 96 poços (1×10^4 células por poço) e incubadas em meio DMEM contendo 10% de SFB, durante 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida as células foram submetidas ao tratamento das diferentes amostras dos NCs(A, AR, RA e RB) e diferentes concentrações (5, 50, 100 e 250 µg/mL). Após 24 horas de tratamento, o meio de cultura foi retirado dos poços, lavado com PBS (phosphate buffer solution), e colocada a solução de marcação das células para a análise da viabilidade celular. Utilizou-se 2,5 µL de IP (Sigma-Aldrich, excitação/emissão de 535/617nm) e 10 µL de Hoechst 33342 (Thermo Scientific, Fisher, IL, EUA, excitação / emissão de 350 nm/461 nm). Foram adicionados 30 µL em cada poço desta solução e incubada por 10 minutos. O IP cora o núcleo de células mortas, enquanto o Hoechst 33342 cora o núcleo de todas as células vivas. As imagens fluorescentes foram adquiridas por um sistema de alto conteúdo do *Operetta High Content System* (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA). O número de núcleos corados foi contado automaticamente e a viabilidade foi calculada como uma proporção de número de núcleos corados com IP e número de núcleos corados com Hoechst (% de citotoxicidade = $\frac{\text{\# de núcleos corados com IP}}{\text{\# de núcleos corados com Hoechst}} \times 100$)¹ pelo Software Harmony® [45].

3.1.8 Ensaio de localização dos NCs de TiO₂ dopados com Eu

As CTM-TAs foram semeadas em duas microplacas de 24 poços ($0,5 \times 10^4$ células por poço) por cima de lamínulas circulares de 13mm e incubadas em DMEM+10% de SFB, durante 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. As células foram tratadas com os NCs da amostra RB em diferentes concentrações (5, 50, 100 e 250 µg/mL), e incubadas por 24 horas. Em seguida, foi realizada a fixação das lamínulas com paraformaldeído 4% e montadas em lâminas com o corante Dapi (ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI). A visualização foi realizada utilizando o microscópio Confocal A1+Nikon. A quantificação foi realizada pelo programa ImageJ, quanto à intensidade de fluorescência, adotando como padrão o valor de 60, para eliminar os *debris*.

¹ Razão entre as células inviáveis (positivas para IP) e células viáveis (marcadas somente com Hoeschst).

3.1.9 Ensaio de *wound healing*

As CTM-TAs (5×10^4 células por poço) foram semeadas em microplacas de 24 poços e incubadas em DMEM+10% de SFB, durante 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂, sendo adicionado os tratamentos com NCs de TiO₂ da amostra RB nas concentrações de 5, 50, 100 e 200µg/ml. Após 24 horas de tratamento com os NCs foi realizado o ensaio de *wound healing*, confeccionando a ferida, ou seja, com a ponta da pipeta de 200ul fez-se um risco em linha reta na região mediana de cada poço e, para posterior avaliação da migração. Para a remoção dos *debris* resultante da lesão, os poços foram lavados com solução salina tamponado com fosfato (PBS). Utilizou-se o tempo de migração em horas que foram de 0 e 24 horas através de fotografia(microscópio EVOS FL Cell Imaging System). O ensaio foi realizado em triplicata. A análise da taxa de migração foi avaliada pelo *software* Image J.

3.1.10 Metabolômica

A análise metabolômica foi realizada a partir da coleta de 100 µl do sobrenadante da cultura das CTM-TAs tratadas com os NCs de TiO₂ das 4 amostras (A, AR, RA e RB) na concentração de 200µg/ml. Foi escolhida a maior concentração para ter maior possibilidade de liberação de diferentes compostos.

Preparo das amostras para metabolômica

Após a coleta do sobrenadante foi adicionado 1 mL de metanol grau espectroscópico e a mistura incubada por 4 h a -80°C, e em sequência, centrifugada por 15 min à 13.000 x g. Os sobrenadantes foram transferidos para outros microtubos para que fosse feita a concentração da amostra em concentrador a vácuo, por 30 min e, subsequentemente, as amostras foram liofilizadas. Para as análises de espectrometria de massa as amostras foram ressuspensas em 500 µL de metanol grau espectroscópico e filtradas em filtro de 0,22 µm.

Análise de Espectrometria de Massas com ionização de *eletrospray*(IES/EM) por infusão em fluxo

As análises de espectrometria de massas foram realizadas com um cromatógrafo líquido (marca Agilent modelo Infinity 1260) para injeção das amostras, acoplado a um

espectrômetro de massas de alta resolução tipo Q-TOF da marca Agilent modelo 6520 B com fonte de ionização por *electrospray* (IES). Os parâmetros cromatográficos foram: 0,2 mL.min⁻¹ de fluxo constante da fase móvel com a composição de 90 % metanol e 10 % de água acidificada com ácido fórmico (0,1 % (v.v⁻¹)), o volume de injeção das amostras foi de 2 µL. Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás secante a 8 L.min⁻¹ a uma temperatura de 220°C e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5 KVa. Os dados foram adquiridos nos modos positivos e negativos.

Análise Quimiométrica

Os dados da análise de espectrometria de massas foram transportados para o ambiente MATLAB, versão R2015a, passaram por normalização, onde entende-se que para cada um dos valores de m/z de todos os espectros, foi achado o maior valor de abundância relativa e, esse, igualado a 100%. Então, para os outros valores de abundância relativa daquela m/z em questão, foram atribuídos valores proporcionais em porcentagem.

Os picos (valores de m/z) com abundância menor ou igual a 8% da abundância máxima foram retirados. Esse limite de corte é definido comparando o desempenho da análise dos componentes principais (PCA) para vários limites testados.

A matriz para análise foi feita de acordo com a tabela abaixo.

Tabela 3 – Matriz da análise metabolômica (quimiometria) realizada para as amostras (A,AR,RA e RB) e controle (Meio de cultura – DMEM) de NCs com duas repetições.

GRUPOS	TRATAMENTOS
1	NCs Anatase (A) 200µg
2	NCs Anatase/Rutilo (AR) 200µg
3	NCs Rutilo/Anatase (RA) 200µg
4	NCs Rutilo/Brookita (RB) 200µg
5	Controle (meio de cultura DMEM)

Os modelos de PCA foram construídos usando o PLS_Toolbox, versão 8.62, seguindo as combinações apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 – Comparações realizadas entre os grupos de NCs por meio das análises dos componentes principais (PCA) considerando todos os metabólitos gerados para a análise quimiométrica.

AMOSTRA ANALISADA	GRUPO	DESCRIÇÃO DA AMOSTRA
A1	4 5	RB x CONTROLE
A2	3 5	RA x CONTROLE
A3	2 5	AR x CONTROLE
A4	1 5	A x CONTROLE
A5	1 2 3 4	A x AR x RA x RB

3.2 Ensaios in vivo

3.2.1 População amostral

O protocolo de pesquisa foi submetido à apreciação e aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo 097/15.

Foram utilizados 39 (trinta e nove) ratos machos (*Rattus norvegicus albibus* Wistar), provenientes da Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU), com 45 dias, e peso médio de 90g. O monitoramento do peso foi feito diariamente para avaliação da saúde, com o auxílio de balança, até atingirem o peso médio de 280g na idade de 90 dias.

Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais apropriadas com recipientes garantindo alimento e água suficientes para a sobrevivência, além do controle de ambiente de 12 horas claro e 12 horas escuro (LD 12:12), com temperatura constante de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar em $50\pm 5\%$, a fim de garantir o correto ciclo do metabolismo dos animais [46].

3.2.2 Grupos Experimentais

Os animais foram submetidos a instalação dos dispositivos para a expansão maxilar. Após 7 (sete) dias da instalação dos dispositivos para expansão maxilar, os animais foram divididos nos seguintes grupos:

Grupo I – Controle, com aplicação local de soro fisiológico;

Grupo II – Aplicação local de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo com nanocristais de TiO_2 (RB na concentração de $50\mu\text{g/ml}$) dopados com Európio;

Grupo III – Aplicação local de nanocristais de TiO_2 (RB na concentração de $50\mu\text{g/ml}$) dopados com Európio;

Grupo IV – Aplicação local do sobrenadante da cultura de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo com NCs TiO_2 (RB na concentração de $50\mu\text{g/ml}$) dopados com Európio;

Grupo V – sem nenhum tratamento.

3.2.3 Procedimento de aplicação dos tratamentos

Antes dos procedimentos de montagem do aparelho disjuntor, os animais foram anestesiados com uma associação de 0,12ml/100g de cloridrato de cetamina 10% (Syntec) e 0,06ml/100g de xilazina 2% (Syntec) por via intraperitoneal. A aplicação dos tratamentos foi realizada na região da pré-maxila.

3.2.4 Tratamentos e coleta de material

Os tratamentos utilizando CTM-TA e NCs foram realizados aplicando na papila incisiva 200 μ l de solução contendo 2×10^5 de células-tronco mesenquimais e nos tratamentos contendo NCs da amostra RB na concentração de 50 μ g/mL.

Após 21 dias os animais foram submetidos a eutanásia para a coleta do material, onde o método escolhido foi de anestesia com superdosagem [46].

Para a obtenção das peças, a dissecação foi realizada inicialmente com o auxílio de bisturi e lâmina número 12 para o descolamento da mucosa jugal das maxilas. Posteriormente utilizou-se uma tesoura de ponta romba, executando um corte tangencialmente a face distal do terceiro molar, outro na porção anterior e dois, bilateralmente as maxilas direita e esquerda, possibilitando desta forma a remoção da peça. Também foram removidos os pulmões, rim e fígado através da utilização de uma tesoura para fazer a abertura abdominal.

As peças obtidas foram fixadas em paraformaldeído a 4% tamponado com fosfato de sódio a 0,1M (pH 7,4) e as maxilas foram descalcificadas com EDTA por 4 semanas.

3.2.5 Análise de fluorescência

As peças anatômicas da maxila e do pulmão foram colocadas no equipamento *in vivo* MS FX PRO Carestream (Bruker, Woodbridge, CT, EUA) para obter as imagens de fluorescência.

Para a análise de fluorescência, a maxila, fígado, pulmão e rim e foram avaliados, aplicando comprimentos de onda de 550 nm e 600 nm para excitação e emissão do fluoróforo, respectivamente, durante 1 (um) minuto. Posteriormente realizou a

sobreposição das imagens, que foram analisadas por meio do software Carestream In-Vivo MSFX Pro (Molecular Imaging, 2012)

3.3 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando Graph Pad Prism8.0, Software Inc, USA. Foi realizado o teste ANOVA e diferenças estatísticas foram consideradas quando o $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

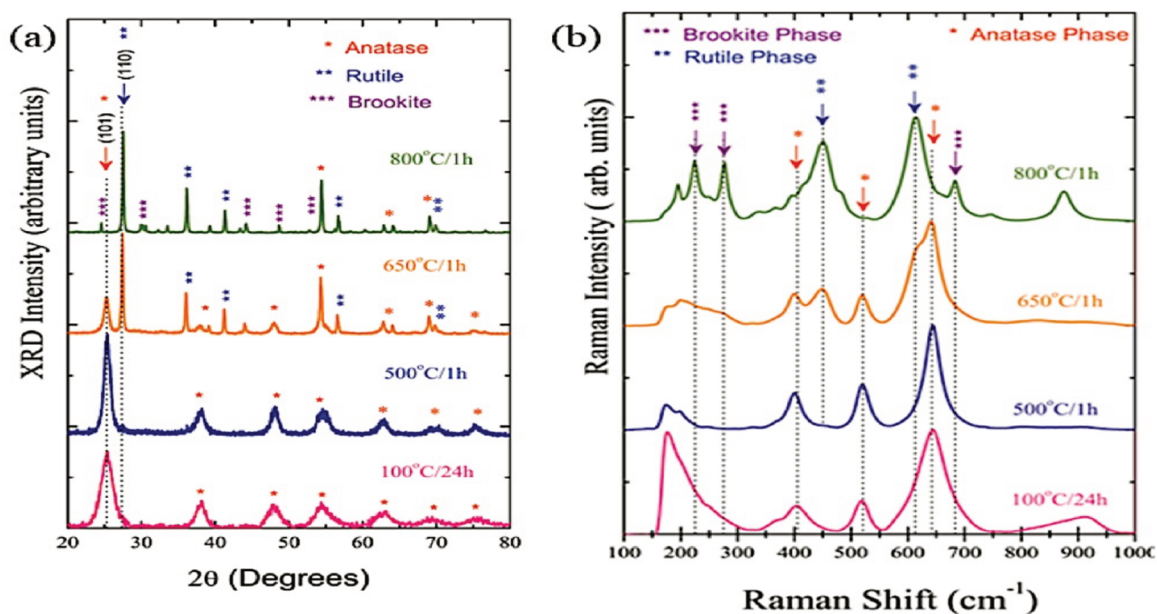
4.1 Caracterização dos NCs de TiO₂ em diferentes combinações de Anatase, Rutilo e Brookita

Após a síntese dos Nanocristais estes foram caracterizados de acordo com os padrões de difração de raio x (XRD) das amostras, que foram sujeitos a técnicas de recozimento a 100°C/24h, 500°C/1h, 650°C/1h e 800°C/1h. Os padrões de difração característica de TiO₂ em anatase(JCPDS: 1: 21-1272), rutilo (JCPDS: 1: 21-1276) e fase de brookita (JCPDS: 29-1360) são representados pelos símbolos (*) (**) e (***), respectivamente. Observa-se no padrão XRD dos NCs de TiO₂ submetidos a recozimento térmico de 100°C/24h que são todos cristalinos e possuem apenas a fase de anatase. O aumento da temperatura de tratamento térmico de 100°C para 500°C foi crucial na transformação da fase anatase para rutilo e o crescimento de NCs. Nas amostras tratadas a 650°C/1h, a transformação da anatase para a fase rutilo foi mais notável e a presença de fase de brookita foi frequentemente observada como subproduto quando a precipitação foi realizada em um meio ácido. Com o aumento da temperatura térmica de recozimento para 800°C/1h, observou-se que os NCs de difração apresentaram 16% da fração em peso de brookita (Fig. 2).

A Figura 2 mostra os espectros de micro-Raman de NCs de TiO₂ sujeitos a recozimento 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 contendo vibrações características de NCs de TiO_2 da fase anatase para a amostra sob termoloxamento a $100^\circ\text{C}/24\text{h}$. O espectro Raman de um cristal único de anatase possui seis modos permitidos a 144 cm^{-1} (E_g), 197 cm^{-1} (E_g), 399 cm^{-1} (B_{1g}), 513 cm^{-1} (A_{1g}), 519 cm^{-1} (B_{1g}) e 639 cm^{-1} (E_g). A banda Raman em torno de 144 cm^{-1} não foi visualizada porque o detector do sistema Raman usou para detectar a faixa de $150\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$. No espectro micro-Raman (Fig. 2b) de amostras de recozimento térmico a $500^\circ\text{C}/1\text{h}$, há também os modos vibracionais da fase anatase. No entanto, havia uma pequena banda em cerca de 450 cm^{-1} associada a um modo vibratório da fase rutilo. Com o aumento da temperatura térmica de recozimento para $650^\circ\text{C}/1\text{h}$ ocorreu a transformação da anatase para a fase rutilo e algumas modificações nos espectros de NCs de TiO_2 . Essas mudanças estão relacionadas à transformação de anatase em fase de brookita, em excelente concordância com os resultados de XRD (Fig. 2a). Nos espectros de NCs de TiO_2 sob térmico de recozimento a $800^\circ\text{C}/1\text{h}$ existem modos de vibração de 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, ambos baseados nos resultados de XRD e micro-Raman, pode-se concluir que os NCs de TiO_2 são de alta pureza e exibem diferentes fases em função do tratamento térmico.

Figura 2 - Caracterização de NCs de TiO_2 , conforme padrões do difratograma obtidos na análise por XRD (a) e micro Raman (b) nas diferentes temperaturas e tempos de síntese ($100^\circ\text{C}/24\text{h}$, $500^\circ\text{C}/1\text{h}$, $650^\circ\text{C}/1\text{h}$ e $800^\circ\text{C}/1\text{h}$).



4.2 Marcação luminescente dos NCs de TiO₂ com Eu

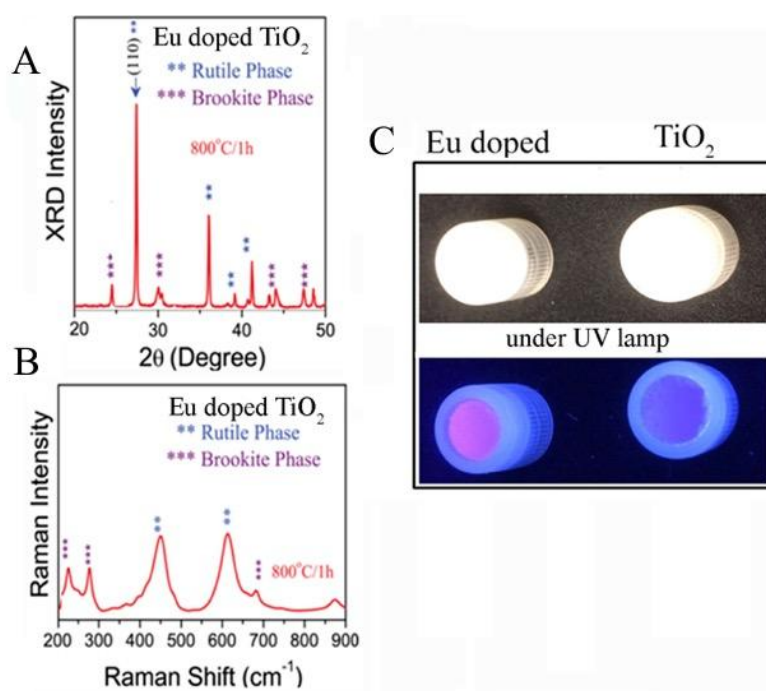
Na fase cristalina, a composição e o tamanho dos NCs TiO₂ dopados com európio (Eu) foram investigadas por XRD e espectroscopia Raman (Fig. 3A e 3B), que mostram os padrões de difração de raios X (XRD) das amostras de TiO₂ dopados com Eu sujeitas a aquecimento térmico a 800°C / 1 h. No padrão XRD da amostra com aquecimento térmico a 100°C/24 horas, observou-se os picos de difração de Bragg característicos da fase anatase de TiO₂, confirmando a formação de NCs de TiO₂. O aumento do aquecimento térmico de 100°C a 650°C alterou a formação das fases cristalinas dos NCs em proporções diferentes, favorecendo também o aumento do tamanho das NCs. O aumento do aquecimento térmico a 800°C/1 h resultou na transformação da fase anatase em rutilo com presença de 60% de modos da fase brookita.

A Figura 3B mostra os espectros de Raman das amostras de TiO₂ dopadas em Eu. Todos os espectros foram normalizados até o pico de maior intensidade para facilitar a visualização dos modos ativos da fase anatase, brookita e rutilo presente nos NCs de TiO₂. O aumento da temperatura de aquecimento para 800°C/1h favoreceu a formação de rutilo e brookita, ambos observados no espectro Raman, bem como no difratograma XRD [47]. A ausência de impurezas e outros óxidos nos difratogramas e nos espectros

de Raman reforçam a evidência de que esses NCs de TiO_2 dopados com Eu são de alta pureza (Fig. 3B).

A imagem dos NCs de TiO_2 dopado com Eu na presença de luz ultravioleta (Fig. 3C) apresentou luminescência vermelha, característica dos íons Eu^{+3} , quando comparada às imagens na ausência de luz ultravioleta e às não dopadas, comprovando que os NCs foram marcados com Eu.

Figura 3 - (A) Padrão de XRD da amostra de NCs de RB dopados com Eu. **(B)** Espectro Raman dos NCs da amostra RB dopados com Eu. **(C)** NCs sob luz ultravioleta e visível.



4.3 Morfologia e identificação das diferentes fases por Microscopia eletrônica de transmissão

Para este tipo de amostra, que é formada de partículas nanométricas, a MET é a técnica mais adequada para observar morfologia, tamanho e estrutura cristalina. Importante destacar, que durante a preparação das amostras foram gotejadas em uma

grade com filme de carbono onde ocorre a secagem do meio líquido, por isso, este processo tem uma tendência a induzir aglomeração dos NCs durante a secagem.

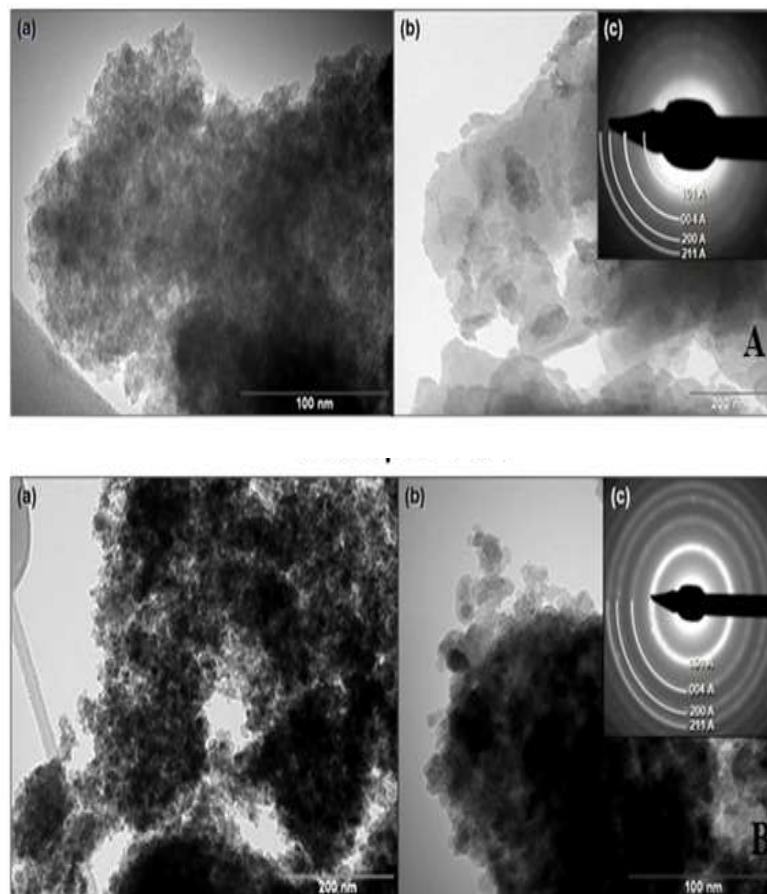
As quatro amostras (A, AR, RA e RB) observadas no MET apresentaram diversas morfologias e presença de diferentes fases. A amostra A apresentou regiões com NCs de anatase de distribuição e tamanho homogêneos e regiões com partículas de tamanhos variados. Na figura 4A(a) pode-se observar um aglomerado de tamanhos de aproximadamente entre 10-20 nm. Vê-se na figura 4A(b) uma região de tamanhos bem variados (10 - 200 nm). O padrão de difração de elétrons da amostra A apresentou os anéis correspondes à estrutura da anatase (fig. 4A(c)), com pouca definição, formados por pontos de baixa intensidade, isto é indicativo de que o material possui uma baixa cristalinidade, em concordância com os resultados de difração de raios-x, onde também apresenta picos de difração de baixa intensidade.

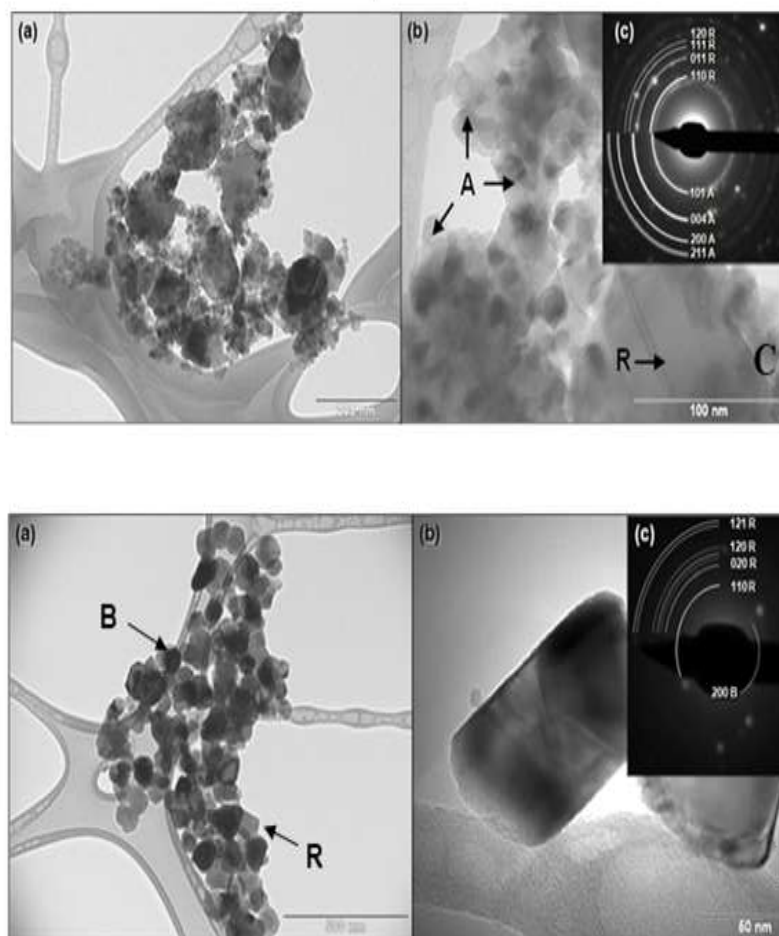
A amostra AR apresentou uma distribuição de tamanho homogênea medindo aproximadamente entre 10-20 nm. Na figura 4B(a) observa-se um aglomerado de anatase. Na figura 4B(b) as partículas não possuem uma morfologia bem definida. O padrão de difração de elétrons da figura 4B(c) apresenta anéis típicos da estrutura da anatase.

A amostra RA apresentou duas espécies bem definidas de NCs que podem ser diferenciadas tanto pela distribuição bimodal de tamanho como também pela presença de duas estruturas cristalinas, correspondente às fases anatase e rutilo, observadas no padrão de difração de elétrons (Fig.4C). A figura 4C(a) revela a coexistência das fases anatase e rutilo. As partículas de menor tamanho, entre 10 - 40 nm correspondem à fase anatase, e as partículas de maior tamanho, entre 100 - 200 nm correspondem à fase rutilo. Observou-se que as partículas de anatase estão em maior número que as de rutilo, mas as partículas de rutilo ocuparam uma fração volumétrica bem maior, mesmo estando em menor quantidade. No padrão de difração de elétrons da figura 4C(c) foram observados anéis de difração correspondentes às estruturas da anatase (tetragonal de corpo centrado) e da rutilo (tetragonal simples), e os anéis correspondentes a anatase são formados por maior quantidade de pontos do que os da rutilo, que são formados por alguns pontos isolados.

A amostra RB apresentou uma distribuição de tamanho dos NCs da ordem de 50 - 100 nm (Fig. 4D(a)). Observou-se a presença de um número muito reduzido de partículas da ordem de 5 - 10 nm (Fig. 4D(b)). O padrão de difração de elétrons da figura 4D(c) apresentou pontos correspondentes às estruturas rutilo (R) e brookita (B). Identificou-se o plano (200) da fase ortorrômbica da brookita de distância interplanar 4,59 Å, a maioria dos pontos de difração correspondem à fase rutilo.

Figura 4 – A) Amostra A: (a) região com NCs de anatase de distribuição de tamanho homogêneo, (b) Região com distribuição de tamanho heterogêneo, (c) Padrão de difração de elétrons da anatase pouco definido. **B)** Amostra AR: (a) NCs da anatase de tamanho homogêneo, (b) Área com NCs em maior magnificação, (c) padrão de difração de elétrons típico da estrutura da anatase. **C)** Amostra RA: (a) Pequeno aglomerado contendo NCs de anatase e de rutilo, (b) Imagem com maior magnificação identificando as partículas de anatase (partículas menores), A e as partículas de rutilo, R, (partículas maiores), (c) padrão de difração de elétrons indica com anéis correspondentes às estruturas de anatase (A) e rutilo (R). **D)** Amostra RB: (a) pequeno aglomerado de NCs de tamanho homogêneo, (b) Imagem dos NCs em maior magnificação, (c) Padrão de difração de elétrons contendo anéis.





4.4 Análise de DLS (Dynamic Light Scattering - Espalhamento Dinâmico de Luz)

Após a dispersão dos NCs de TiO_2 utilizando desintegrador ultra-sônico, a técnica de DLS foi utilizada para medir o tamanho do aglomerado dos NCs de TiO_2 quando dispersos em meio de cultura e em água deionizada (DI), sendo consideradas a distribuição dos NCs em função da intensidade, área, volume, quantidade e o índice de polidispersão.

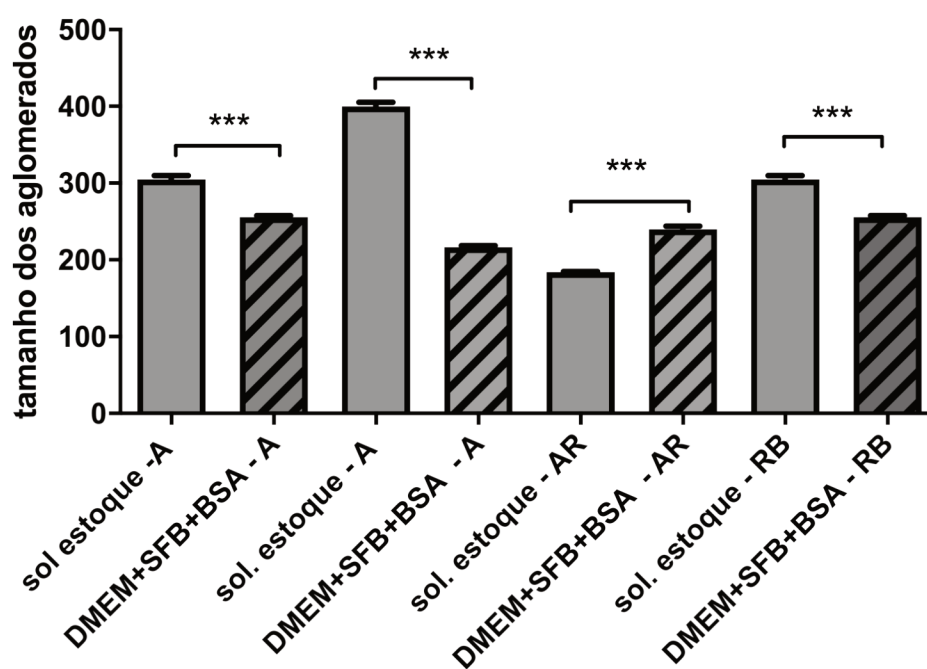
De acordo com os resultados, quando dispersos em meio completo os NCs apresentaram tamanhos similares independentemente da amostra (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores médios do tamanho do aglomerado dos NCs de TiO₂ analisados por DLS, após sonicação em água deionizada e em DMEM+SFB 10%+ BSA nas amostras A, AR, RA e RB.

Amostras NCs TiO₂	TAMANHO ÁGUA DEIONIZADA (DI)	TAMANHO DMEM+SFB+BSA
A (anatase)	269,8 nm	231,46nm
AR (anatase+rutilo)	399,7 nm	216,60 nm
RA (rutilo+anatase)	184,16 nm	239,96 nm
RB (rutilo+brookita)	304,9 nm	255,6 nm

Com as medições de cada análise (DI e meio completo + BSA), observou-se a maior instabilidade dos NCs quando sonicados em DI, devido a sua variação no tamanho dos aglomerados. Quando sonicadas em meio completo verificou-se uma maior estabilidade e uma diminuição do tamanho dos aglomerados formados em relação ao NCs dispersos em DI, com exceção da amostra RA, onde o aglomerado de NCs aumentou de tamanho quando disperso em meio completo (Fig. 5).

Figura 5 – Tamanho dos aglomerados de NCs de TiO₂ das 4 amostras quando sonicadas em DI e em meio completo com BSA. Solução estoque: NCs sonicados em água deionizada. Tamanho dos aglomerados em nanômetro (nm). (ANOVA-Turkey: ***p>0,05)

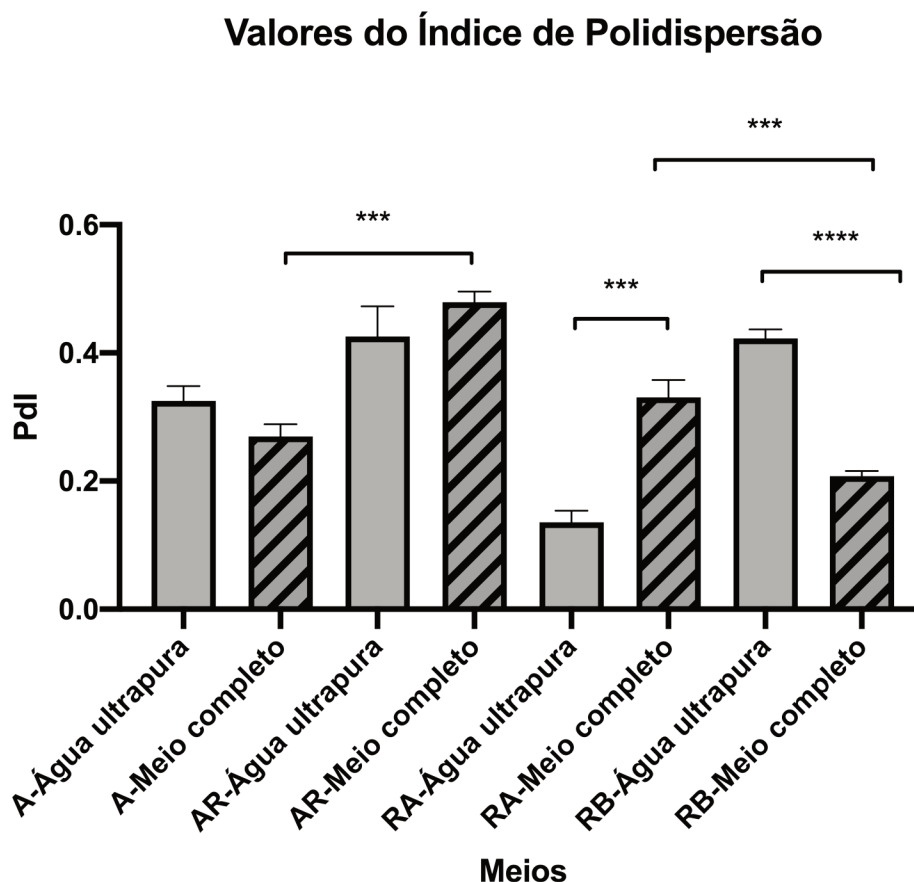


O índice de polidispersão (Pdl) é uma medida de homogeneidade do tamanho das partículas analisadas e um parâmetro usado para indicar a distribuição do tamanho dos NCs, variando-se entre 0 a 1. Valores abaixo de 0,3 indicam que os NCs apresentam-se monodispersos, ou seja com alta homogeneidade[48] . Analisando o Pdl observou-se algumas diferenças entre as amostras de NCs em diferentes meios, conforme a Tabela 6 e gráfico da figura 6.

Tabela 6 – Valores do Pdl nas 4 amostras de NCs em DI e meio completo (DMEM+SFB+BSA).

ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (PDI)	ÁGUA DEIONIZADA (DI)	DMEM+SFB+BSA
A (anatase)	0,41	0,27
AR (anatase+rutilo)	0,42	0,47
RA (rutilo+anatase)	0,13	0,33
RB (rutilo+brookita)	0,42	0,20

Figura 6 – [Índice de polidispersão (Pdl) dos NCs em diferentes meios. (ANOVA-Turkey: ***p > 0,05)

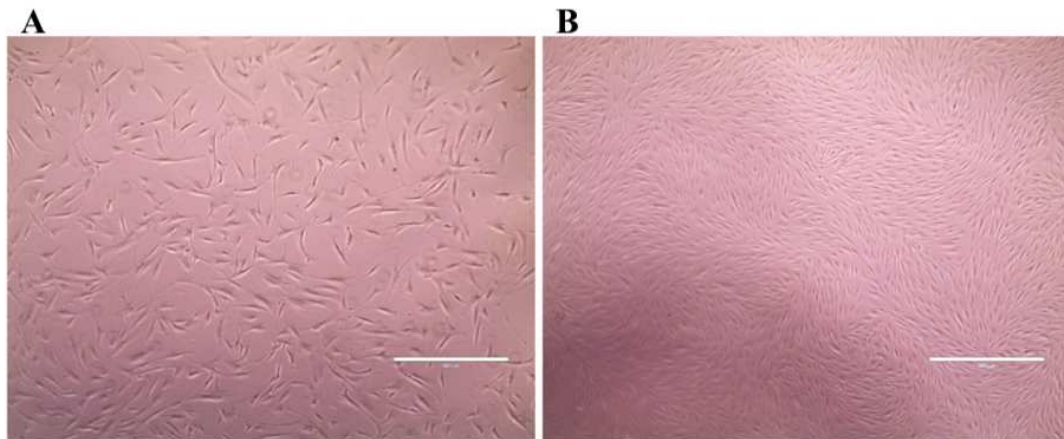


Nestes resultados verificou-se que as amostras A e RB apresentaram o menor Pdl em meio de cultura completo, significando que possuem maior homogeneidade, assim tendo maior estabilidade física destes NCs, podendo ser um fator que reduz os danos que podem ser causados nas células e por isso a baixa taxa de citotoxicidade causada utilizando os NCs após sua dispersão em meio completo contendo BSA.

4.5 Caracterização das células-tronco mesenquimais humana de tecido adiposo

Após o processo de isolamento e início do cultivo celular, as células apresentaram formato fibroblastóide em monocamada e aderentes ao plástico, que correspondem aos primeiros requisitos para caracterização das CTMs (Fig. 7).

Figura 7 - Morfologia das CTM-TA em segunda passagem: aderente e morfologia fibroblastóide. Fotografia obtida através de microscopia eletrônica nos aumentos de 10x **(A)** e 4x **(B)**, respectivamente.



A imunofenotipagem por citometria de fluxo foi realizada utilizando os painéis de anticorpos positivos CD 73 (APC), CD 105 (AF 488), CD 90 (PE/CY7), CD 29 (AF488), CD 13 (APC), CD 44 (PE/CY7) e negativos: CD 31 (AF 488) E CD 45 (APC).

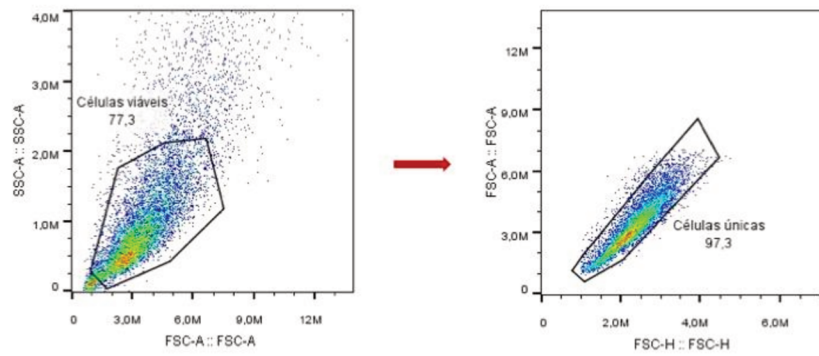
Verificou-se 77,3% das células viáveis, sendo que 97,3% são específicas de células-tronco (Fig. 8A).

As células apresentaram os marcadores positivos CD29, CD 13, CD 44, CD 73, CD 90 e CD 105 e os marcadores negativos CD44 e CD31 (Fig. 8B-C).

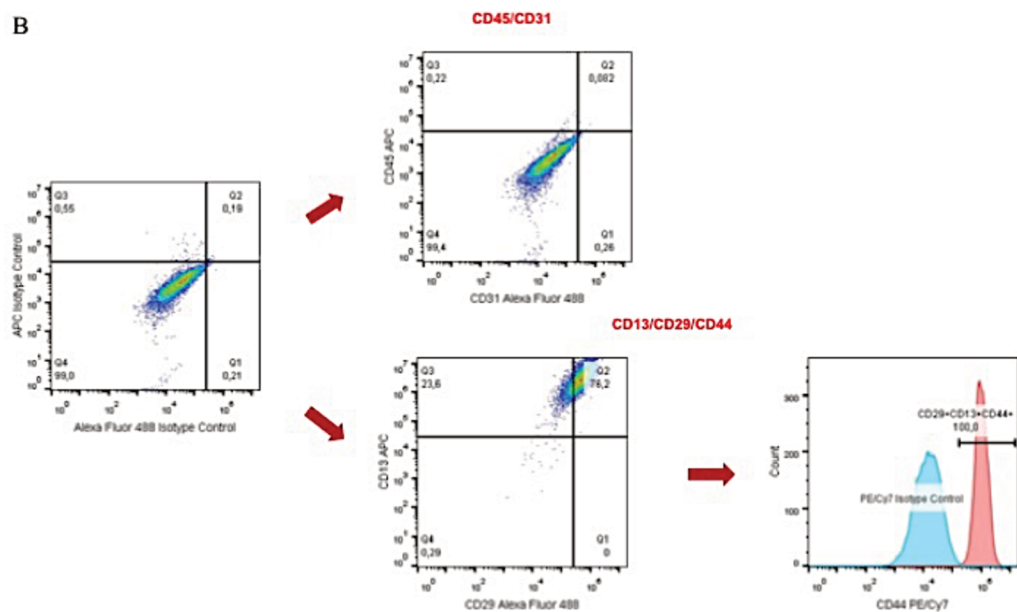
Estes resultados mostraram que as células isoladas apresentaram os critérios determinados pela ISTC para caracterização de uma população de CTM [25] (Fig.8).

Figura 8 - Análise dos marcadores positivos e negativos da população de CTM-TA por citometria de fluxo. **A)** Viabilidades das células analisadas; **B)** Marcadores negativos CD31 e CD45, marcadores positivos 13, 29 e 44; **C)** Marcadores positivos 73, 90 e 105.

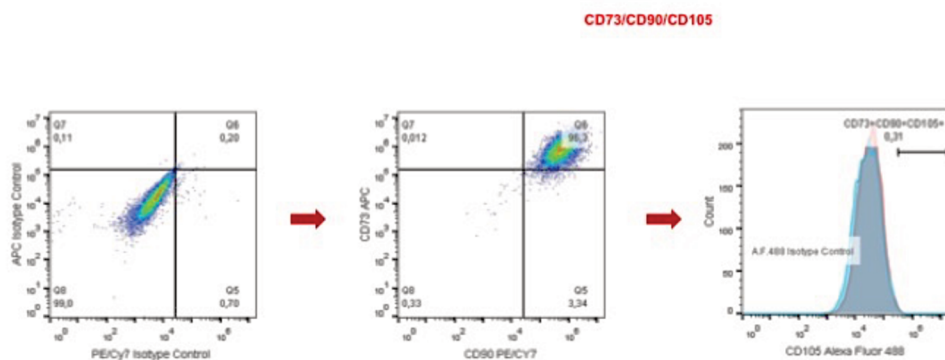
A



B



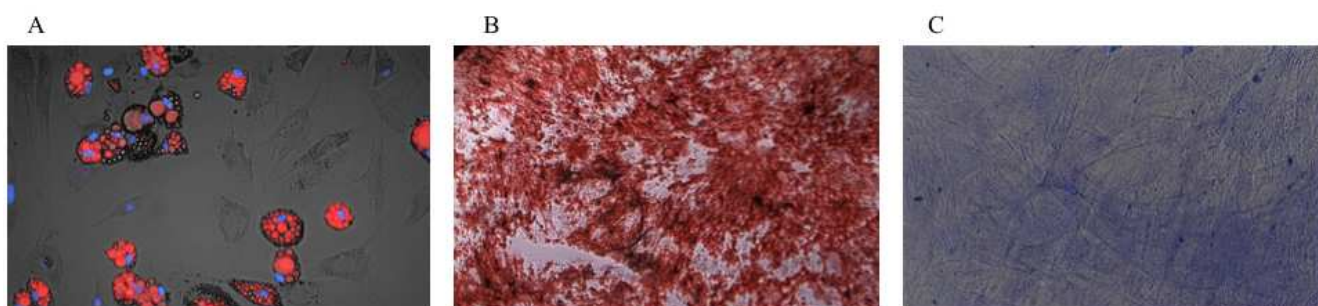
C



Foi confirmada a capacidade de diferenciação celular osteogênica, condrogênica e adipogênica, com a utilização dos meios indutores para cada caso. A presença de vacúolos ricos em lipídeos corados com Oil-Red foi utilizada para detectar a indução

adipogênica (Fig. 9-A). A diferenciação osteogênica foi verificada pela visualização da mineralização da matriz extracelular corada com Vermelho de Alizarina, o qual cora os cristais de cálcio (Fig. 9-B). Na diferenciação condrogênica a matriz de glicosaminoglicanos foram coradas de azul pelo Alcian Blue (Fig. 9-C).

Figura 9 – A) Diferenciação das CTM-TA na linhagem adipogênica observando gotículas de lipídios coradas com Oil-Red; **B)** Linhagem osteogênica onde observa depósitos de cálcio corado com vermelhos de Alizarina; e **C)** Presença de matriz de glicosaminoglicanos coradas com Alcian Blue na diferenciação condrogênica.



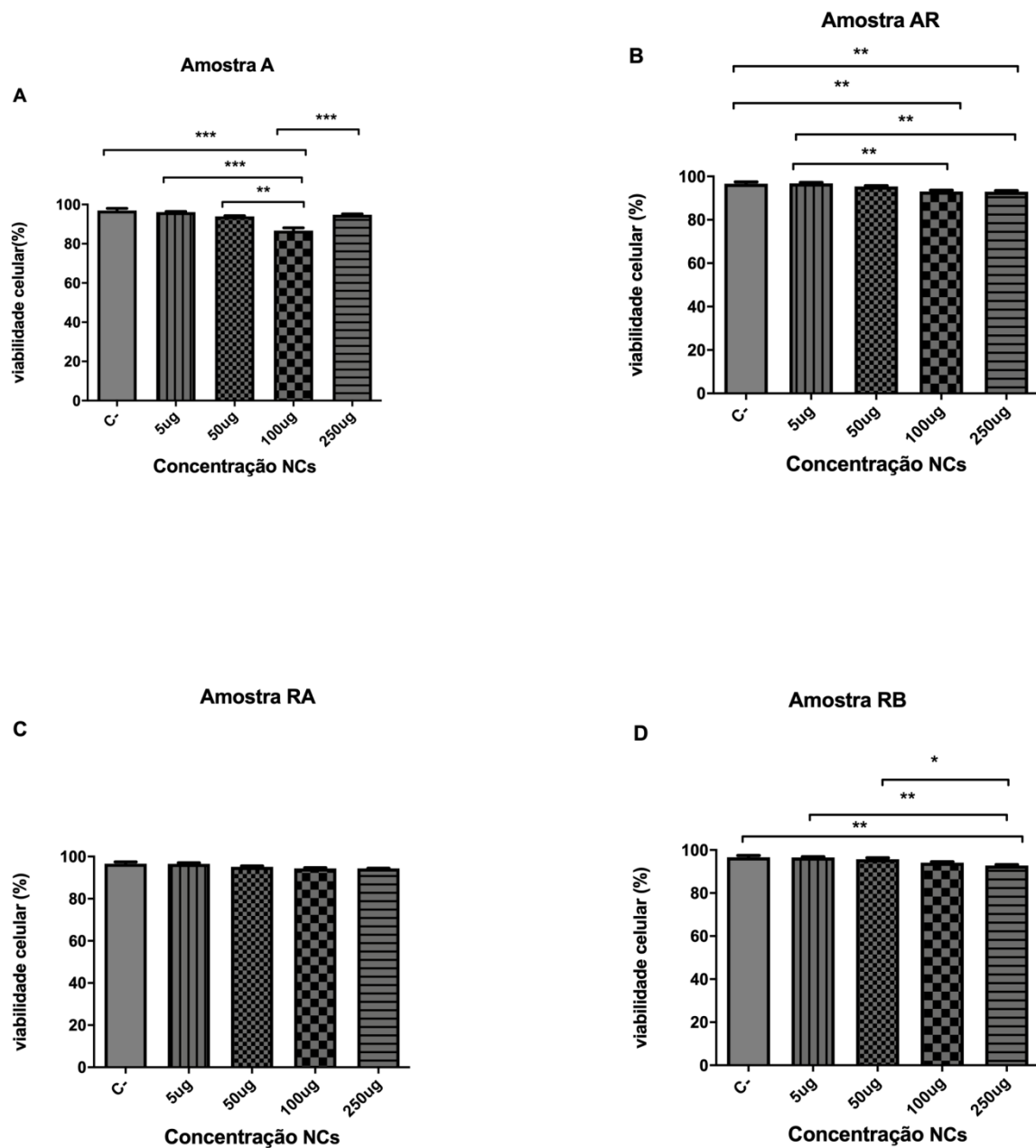
4.6 Ensaio da viabilidade celular

O teste de citotoxicidade das CTM-TAs com NCs de TiO_2 foi avaliado com 24 horas após tratamento. A análise da imagem para quantificação da citotoxicidade é composta por: contagem das células e detecção de núcleos corados pelo Hoechst.

Foi comparada a viabilidade da mesma amostra de NCs com diferentes concentrações, onde observou-se que na amostra A em uma concentração de $100\mu\text{g}$ ocorreu uma redução da viabilidade celular estatisticamente significativa quando comparada com o controle, 5, 50 e $250\mu\text{g}$ (Fig. 10A). Na amostra AR as concentrações de 100 e $250\mu\text{g}$ apresentaram uma redução da viabilidade celular estatisticamente significativa quando comparadas com o controle e com $5\mu\text{g}$ (Fig. 10B). Já a amostra RA não apresentou diferença estatística entre as concentrações analisadas (Fig. 10C). A RB na concentração de $250\mu\text{g}$ apresentou uma redução de viabilidade estatisticamente significativa quando comparada com o controle e as concentrações de 5 e $50\mu\text{g}$ (Fig. 10D). No entanto, mesmo existindo redução significativa de viabilidade em diferentes

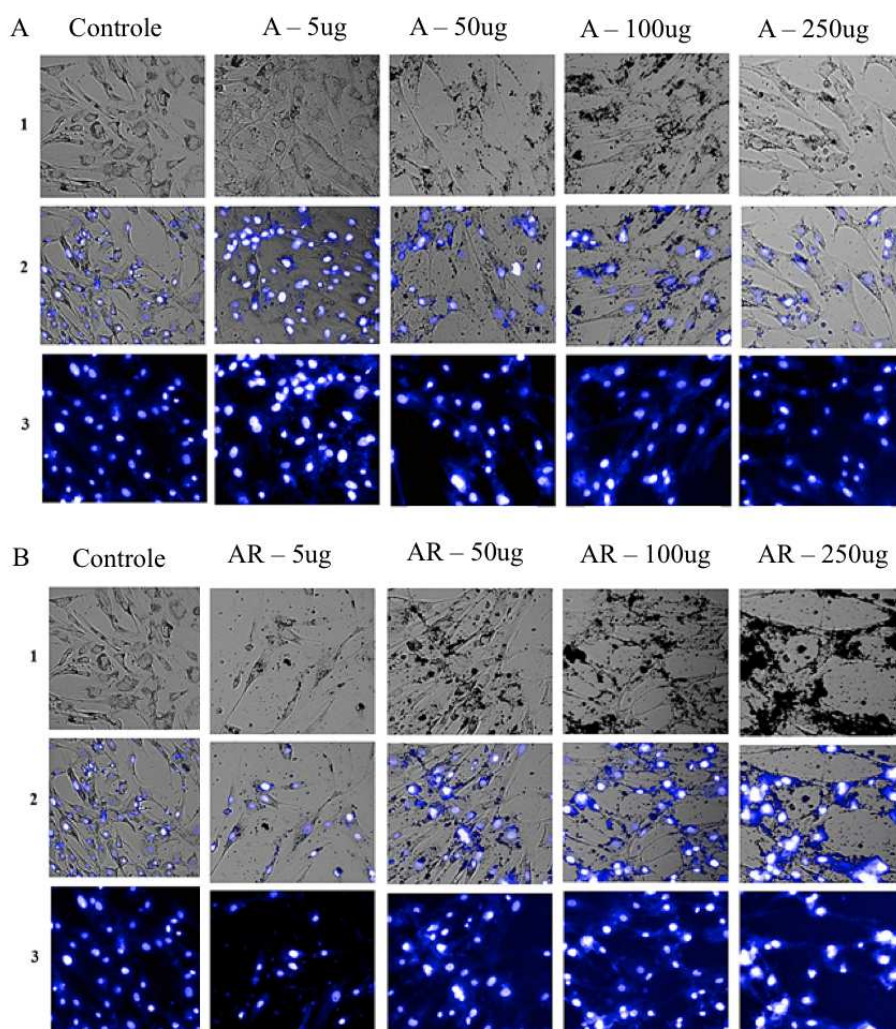
concentrações de NCs nas diferentes fases, a viabilidade celular mínima encontrada foi de 90%, valor no qual as células ainda apresentam boa viabilidade.

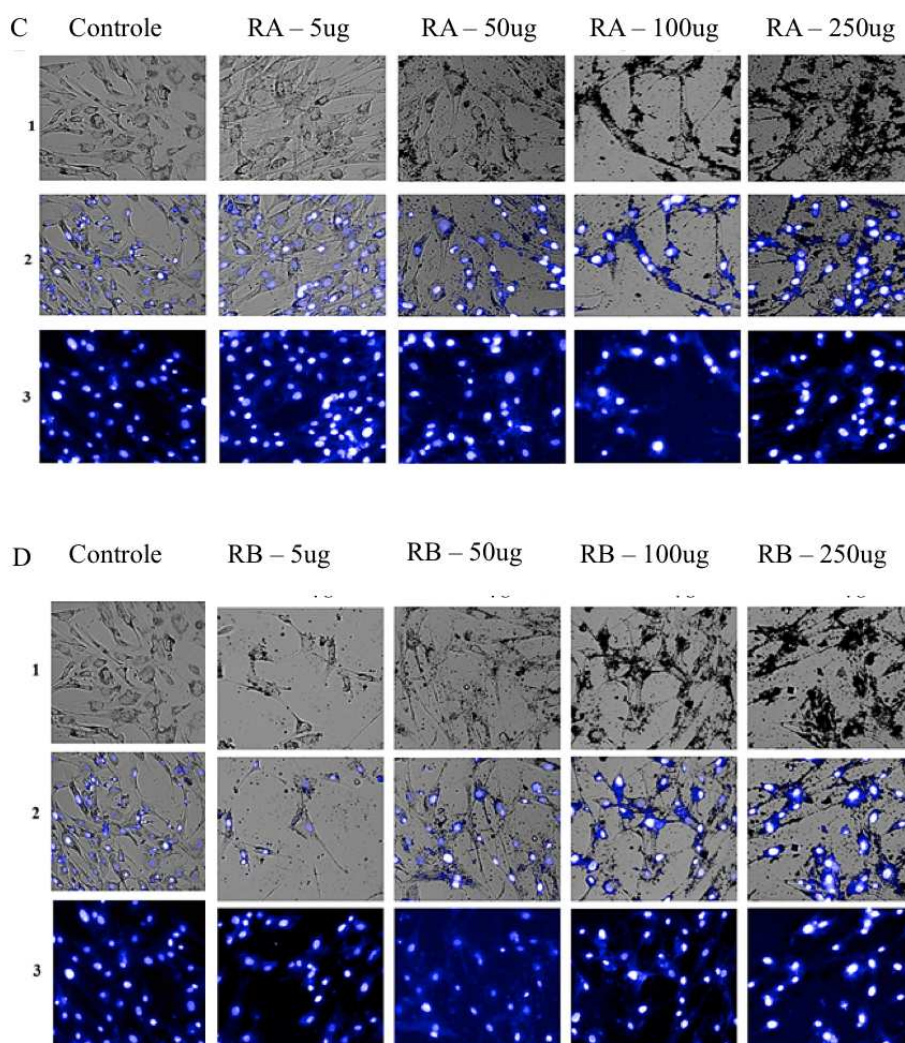
Figura 10 – Viabilidade das CTM-TAs após tratamento com NCs de TiO_2 da mesma amostra e em diferentes concentrações: **A)** Anatase (A), **B)** Anatase-Rutilo (AR), **C)** Rutilo-Anatase (RA) e **D)** Rutilo-Brookita (RB). (ANOVA-Turkey: *** $p > 0,0005$; ** $p = 0,005$; * $p < 0,05$).



A análise de viabilidade celular feita pelo *Operetta High Content System* também avaliou as imagens das CTM-TAs com os NCs de TiO₂. Temos a imagens das células em *brightfield* (campo branco - 11A.1 e 11B.1); completa sobreposta (IP + Hoechst 33342): que cora células mortas (apoptose ou necrose) e com Hoechst que cora células vivas (Fig. 11A.2 e 11B.2); e com Hoechst: somente as CTM-TAs (células vivas) (11A.3 e 11B.3). Estas imagens confirmam a quantificação realizada na figura 10.

Figura 11 – Imagem das CTM-TA com o tratamento dos NCs de TiO₂, quanto à viabilidade celular: **A)** A (anatase); **B)** AR (anatase/rutilo); **C)** RA (rutilo/anatase) e **D)** RB (rutilo/brookita). **Linhas 1:** campo branco; **2:** sobreposição de campo branco e fluorescência; **3:** fluorescência.





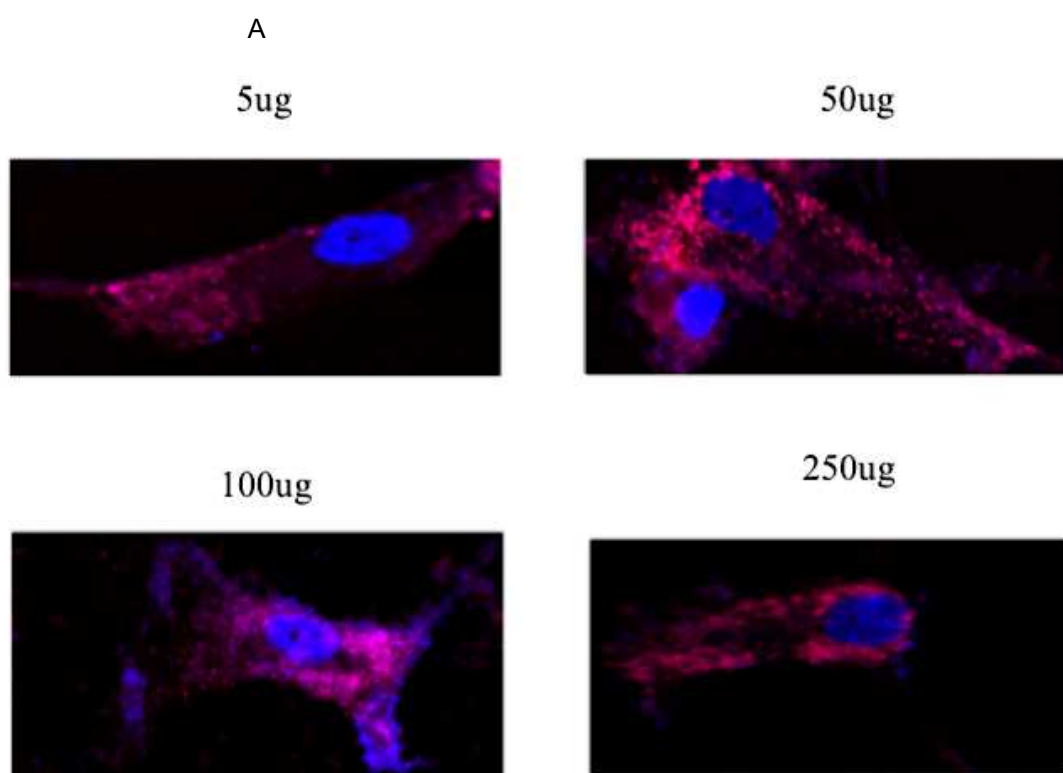
4.7 Ensaio de internalização dos NCs de TiO₂ da amostra RB nas CTM-TAs

O objetivo deste ensaio foi avaliar a capacidade de internalização nas células dos NCs da amostra RB nas diferentes concentrações (5, 50, 100 e 250µg) no tempo de 24 h de tratamento. A escolha do NC RB para o ensaio de localização foi devido a estabilidade apresentada, conforme o ensaio de DLS, a alta viabilidade celular e por possuir em sua composição apenas brookita e rutilo e não anatase, que já foi apresentada em vários trabalhos de pesquisa como tendo maior citotoxicidade e genotoxicidade[49].

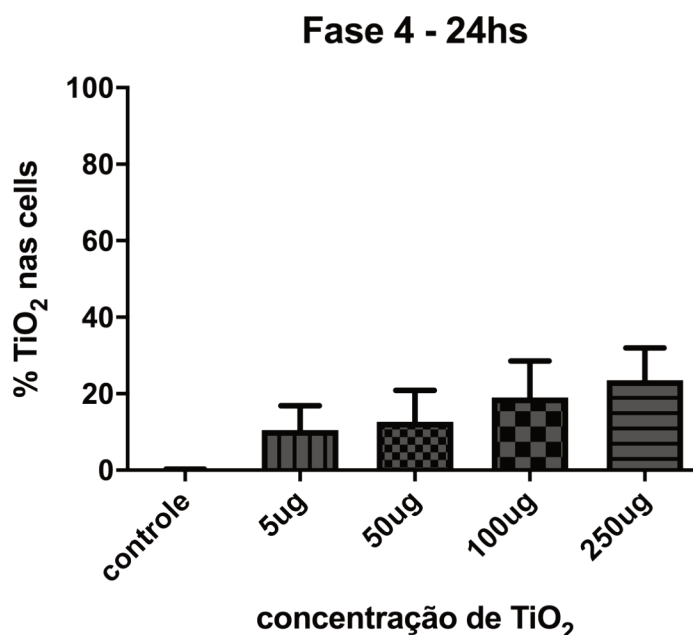
Em nosso estudo, após 24 h de tratamento, verificou-se um padrão de internalização no citoplasma das CTM-TAs nas imagens obtidas por microscópio, pois os NCs estão dopados com Eu e não são visualizados no núcleo esta marcação. O

aumento da concentração dos NCs, aumenta a quantidade de internalização dos NCs (Fig. 12A), mas a análise estatística (GraphPad Prisma) referente a quantificação da área ocupada pelos NCs no interior das células em todas as concentrações, não apresentaram diferença significativa, quando comparada com o grupo controle (Fig.12B).

Figura 12 – A) Imagens feitas com microscópio Confocal após 24 horas de tratamento das CTM-TA com NCs de TiO₂ da amostra RB, nas concentrações 5, 50, 100 e 250µg (aumento de 40x); **B)** Quantificação dos NCs de TiO₂ após tratamento de 24h em CTM-TAs (Programa ImageJ). (ANOVA-Turkey: ***p > 0,0005; **p = 0,005; *p < 0,05).



B



4.8 Ensaio de migração das CTM-TAs tratadas com NCs de TiO₂

Esse método baseia-se na observação, após a criação de um novo espaço artificial, chamado "arranhão", em uma cultura de células aderentes. As células na borda do espaço recém-criado se moverão em direção à abertura para fechar o "arranhão" até que novos contatos célula a célula sejam estabelecidos novamente.

Neste ensaio foi observado o comportamento das CTM-TAs com os tratamentos dos NCs de TiO₂ após 24 horas. Verificou-se que as amostras RB, contendo maior quantidade de rutilo, na concentração de 50µg/ml aumentaram significativamente a migração celular, fechando em torno de 80% o arranhão, sendo que as outras amostras o fechamento ficou entre 20 a 40% após 24hs. Os NCs RA aumentaram significativamente a migração das CTM-TAs na concentração de 50µg/ml quando comparados ao efeito dos NCs na concentração de 150µg/ml. No entanto, os NCs contendo anatase não alteraram a migração celular (Fig. 13 e 14).

Figura 13 – Análise de migração das CTM-TAs após 24h de tratamento com as amostras A (anatase), AR (anatase-rutilo), RA (rutilo-anatase) e RB (rutilo-brookita), onde mostra que na amostra RB com concentração de 50µg/ml houve maior fechamento do arranhão. (ANOVA-Turkey: **p = 0,005; *p < 0,05).

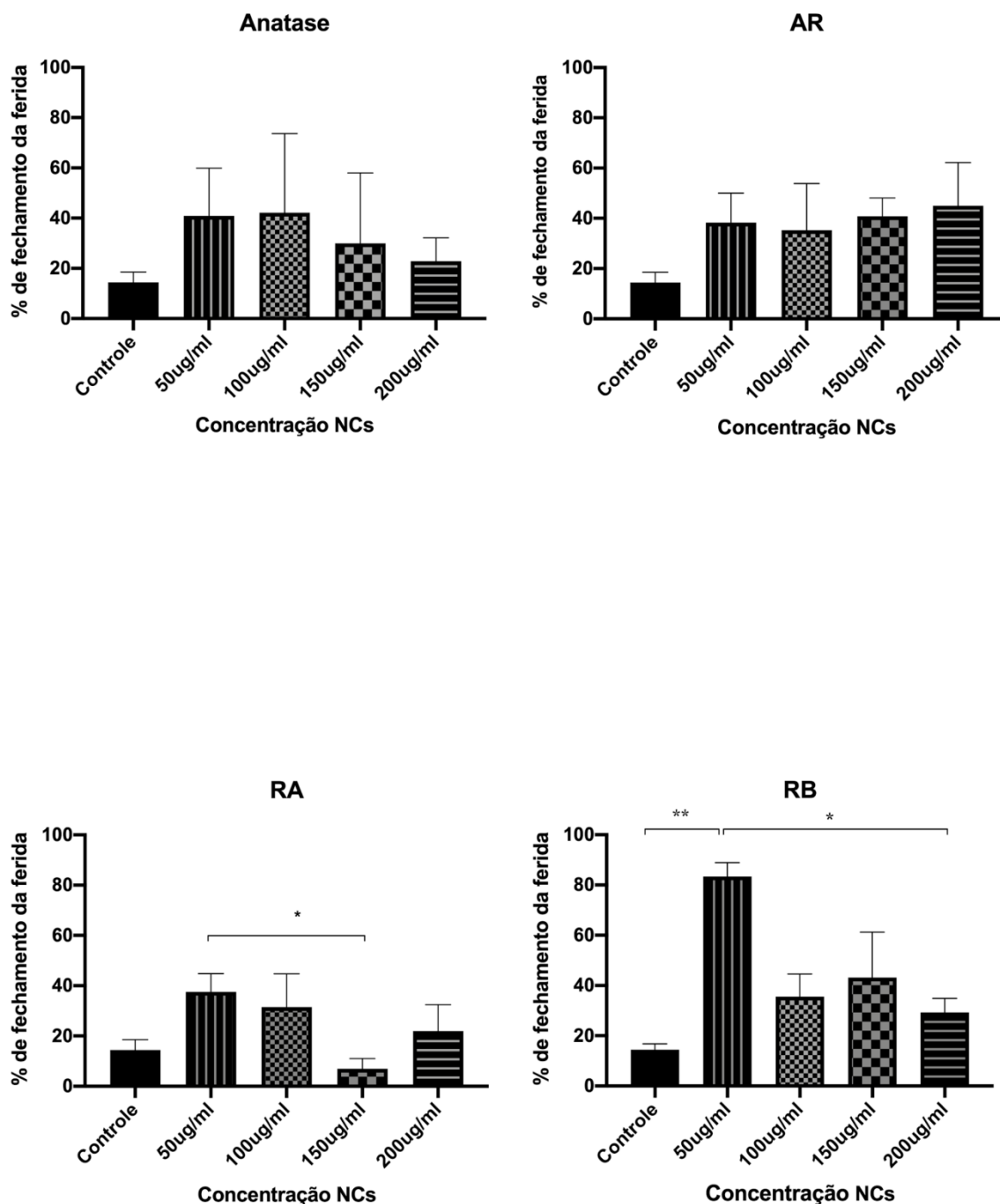
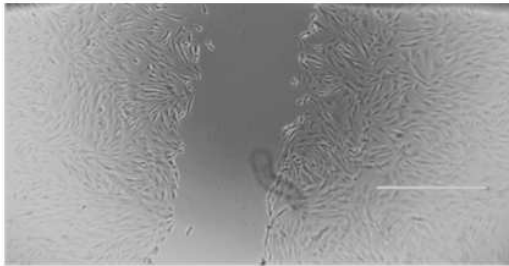
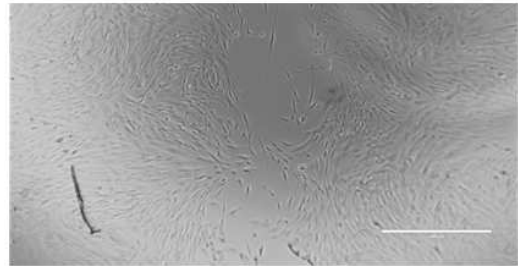


Figura 14 – Imagem feita em microscópio óptico do ensaio de migração demonstrando o fechamento do arranhão no ensaio de migração celular das CTMs tratadas com NCs de TiO₂ com as amostras A, AR, RA e RB nas concentrações 50, 100, 150 e 200 µg.

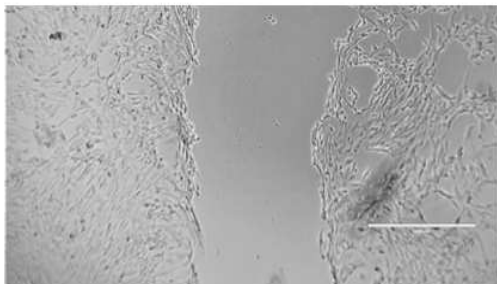
Controle - 0 hs



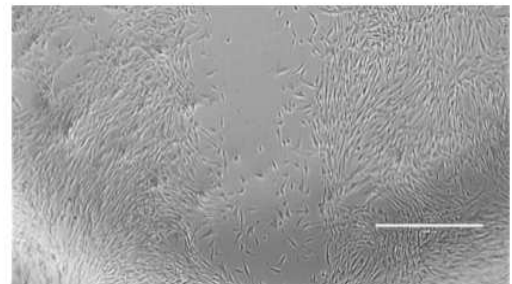
Controle - 24 hs



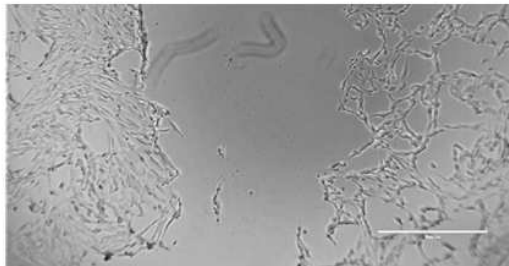
A - 50ug - 0 hs



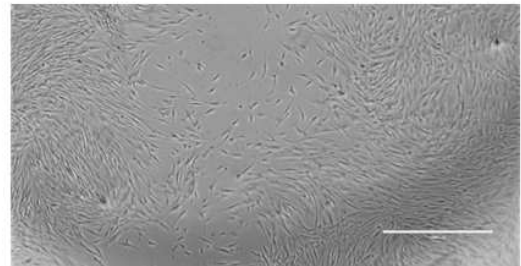
A - 50ug - 24 hs



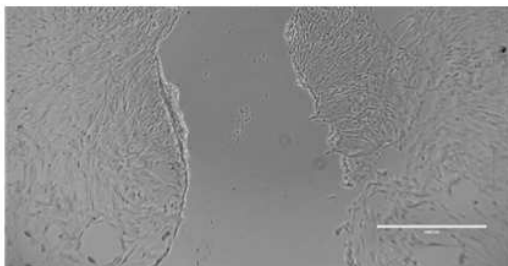
A - 100ug - 0 hs



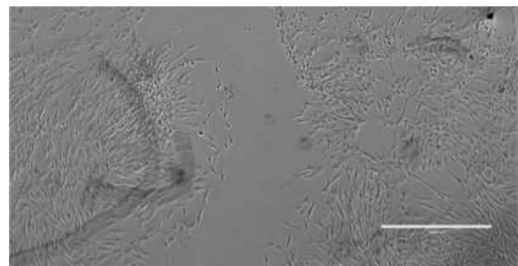
A - 100ug - 24 hs



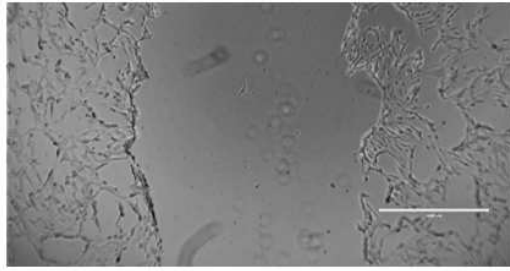
A - 150ug - 0 hs



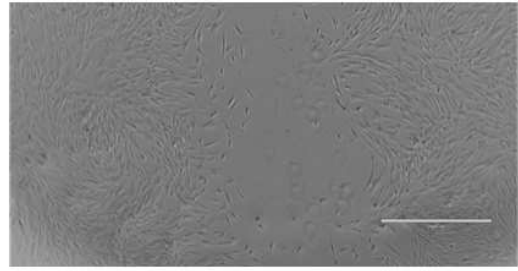
A - 150ug - 24 hs



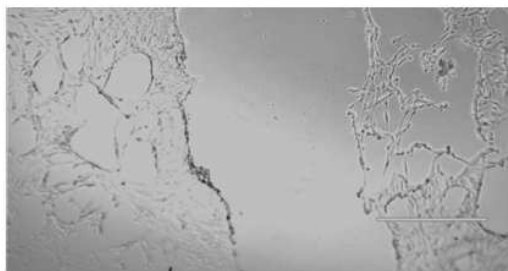
A - 200ug - 0 hs



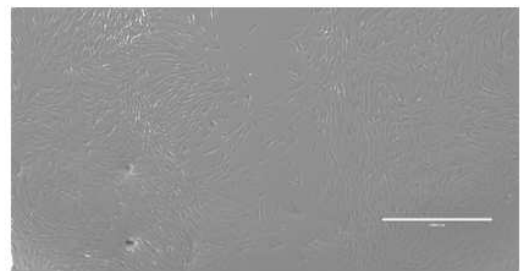
A - 200ug - 24 hs



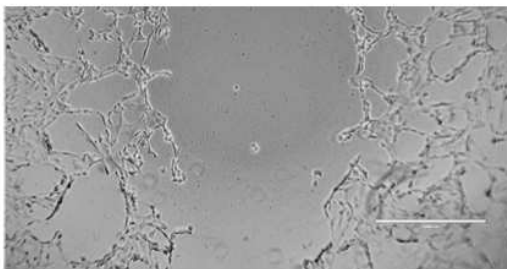
AR - 50ug - 0 hs



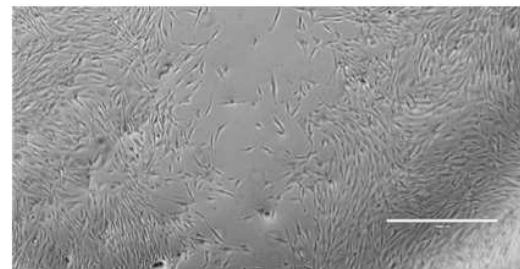
AR - 50ug - 24 hs



AR - 100ug - 0 hs



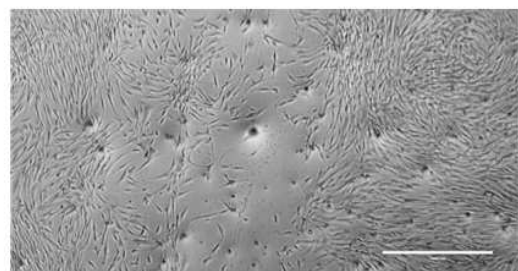
AR - 100ug - 24 hs



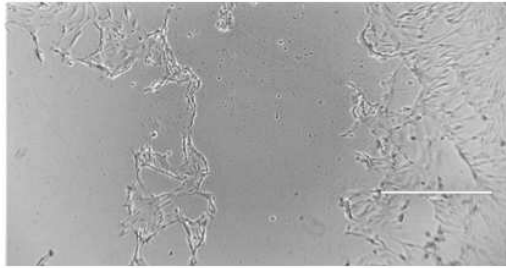
AR - 150ug - 0 hs



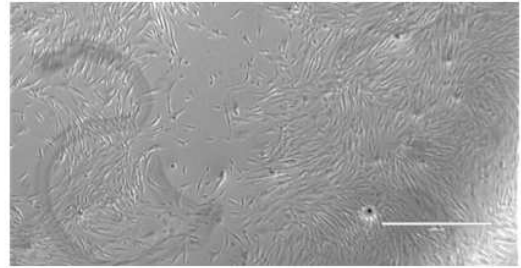
AR - 150ug - 24 hs



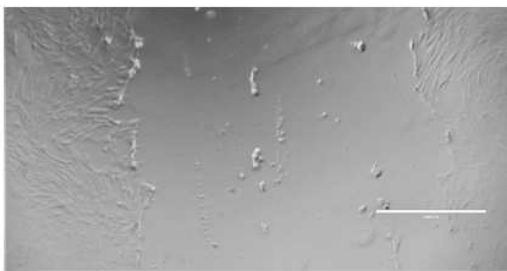
AR - 200ug - 0 hs



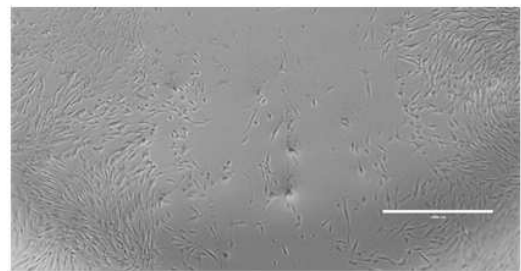
AR - 200ug - 24 hs



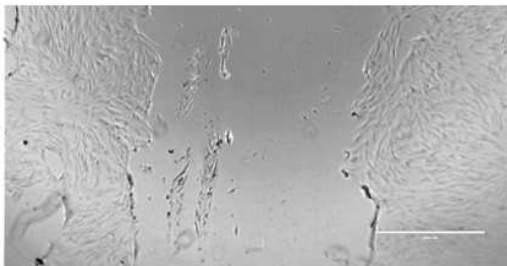
RA - 50ug - 0 hs



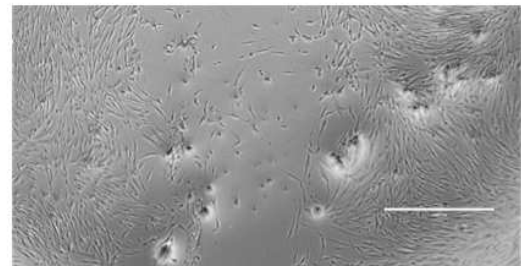
RA - 50ug - 24 hs



RA - 100ug - 0 hs



RA - 100ug - 24 hs



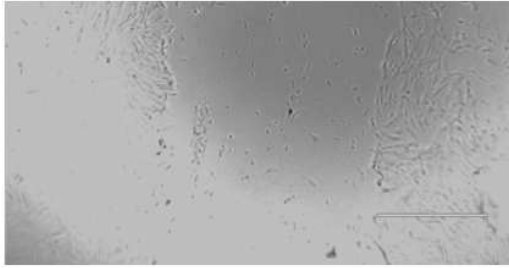
RA - 150ug - 0 hs



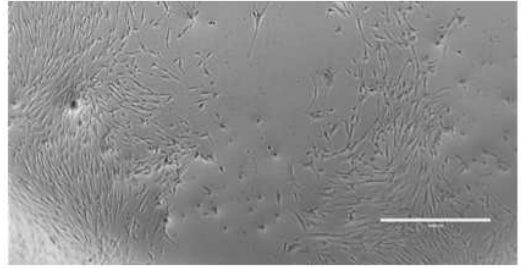
RA - 150ug - 24 hs



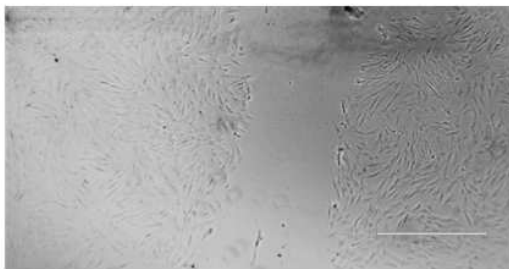
RA - 200ug - 0 hs



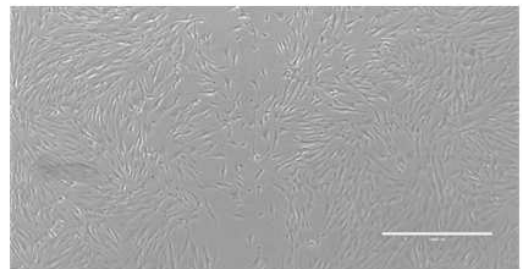
RA - 200ug - 24 hs



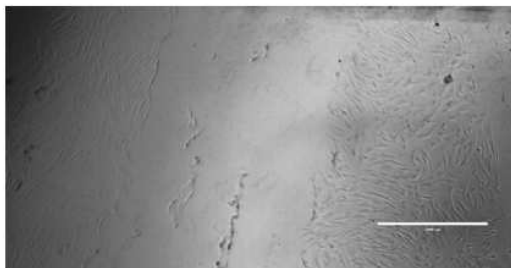
RB - 50ug - 0 hs



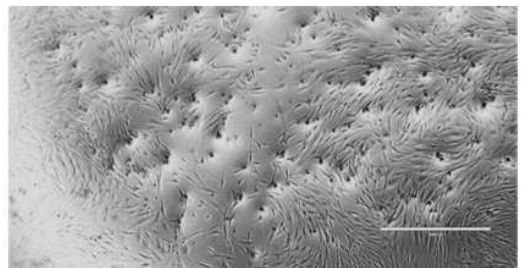
RB - 50ug - 24 hs



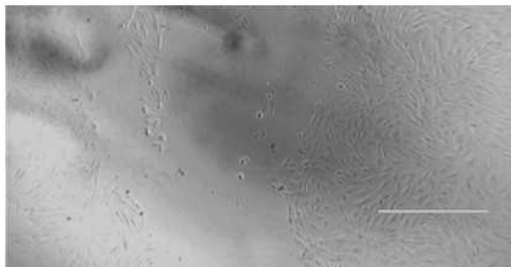
RB - 100ug - 0 hs



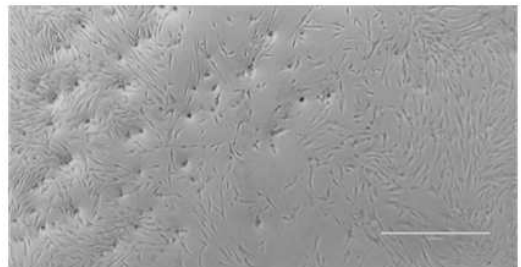
RB - 100ug - 24 hs



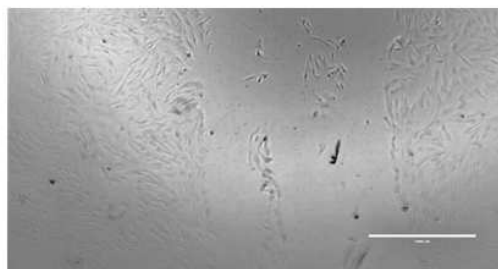
RB - 150ug - 0 hs



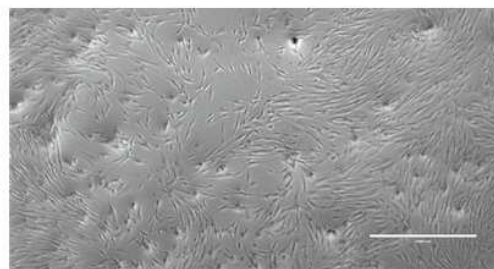
RB - 150ug - 24 hs



RB – 200ug - 0 hs



RB – 200ug - 24 hs



4.9 Uso de PCA em dados de Espectrometria de Massas

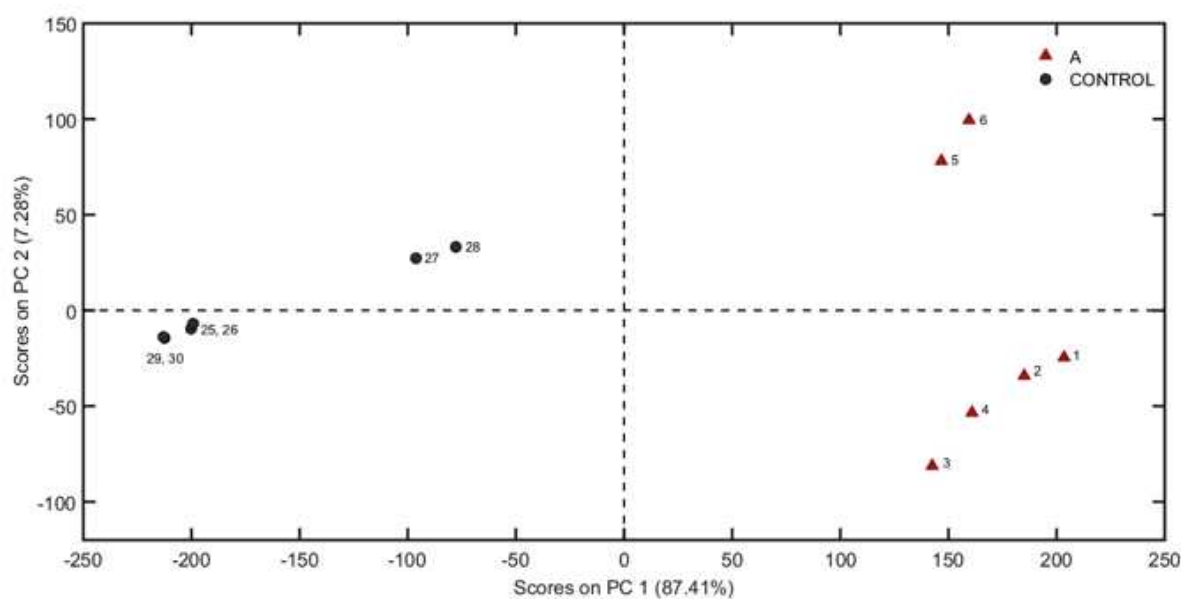
Após análise de PCA e HCA foram obtidos os resultados no modo de ionização positivos e negativos. Modo positivo são moléculas carregadas positivamente e modo negativo são as moléculas que formam ânions.

Modo POSITIVO:

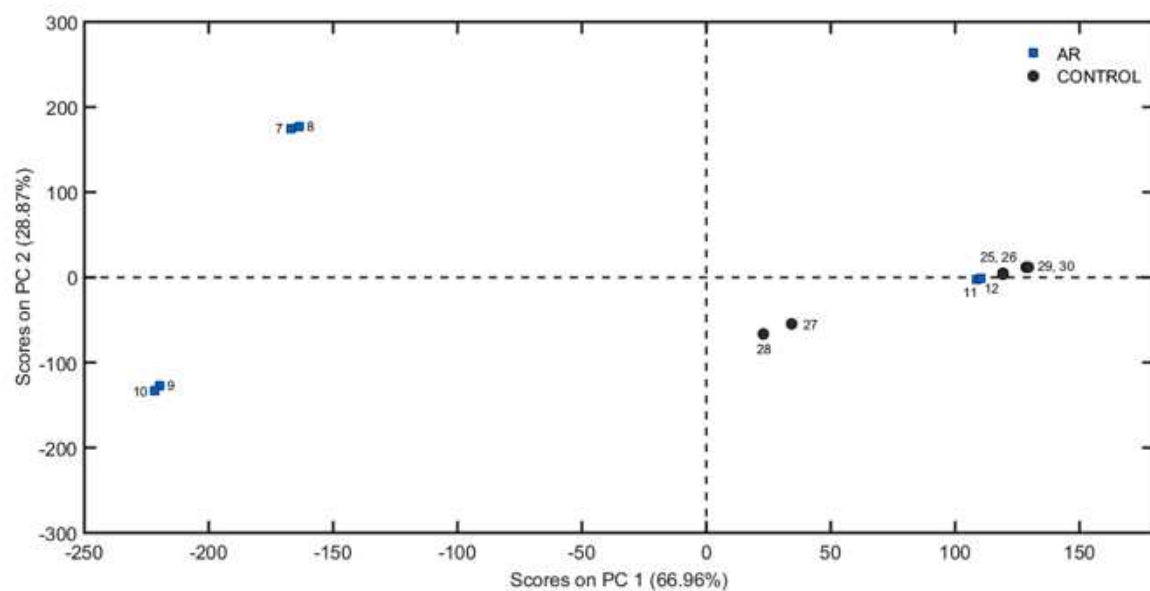
Modelos A1(amostra RB x controle), A2 (amostra RA x controle), A3 (amostra AR x controle), A4 (amostra A x controle): As PCA's foram construídas usando como pré-processamento o *mean center*, obtendo, todas 2 PC's e respectivamente 95,40%; 96,08%; 95,83% e 94,69% de variância explicada(comparação entre as amostras e controle em relação aos compostos encontrados). O modelo A4 teve separação total (Fig. 15-A), o modelo A3 a separação parcial dos grupos (Fig. 15-B), e os modelos A1 e A2 não conseguiram diferenciar as amostras (Fig. 15-C e D). A separação total indica a produção de compostos diferentes nas diferentes amostras. Na separação parcial há alguns compostos semelhantes entre as amostras.

Figura 15 – Análise de PC's comparando no modo positivo das A, AR, RA e RB com o Controle: **A)** Separação total da amostra A em relação ao controle; **B)** Separação da amostra AR em relação ao controle; **C)** Não ocorreu a separação da amostra RA em relação ao controle; e **D)** Não ocorreu a separação da amostra RB em relação ao controle.

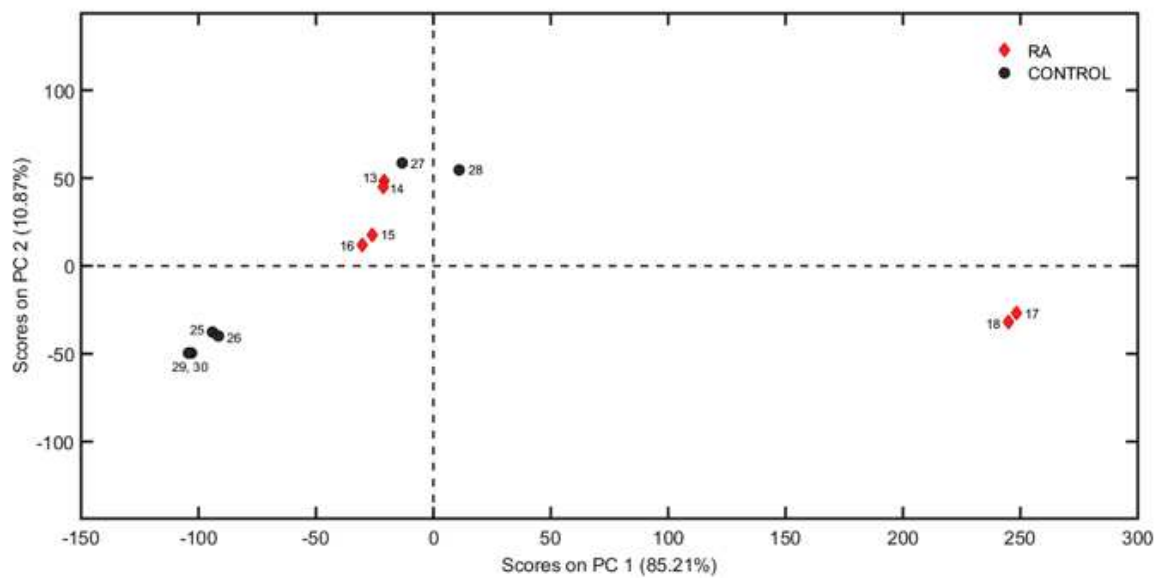
A



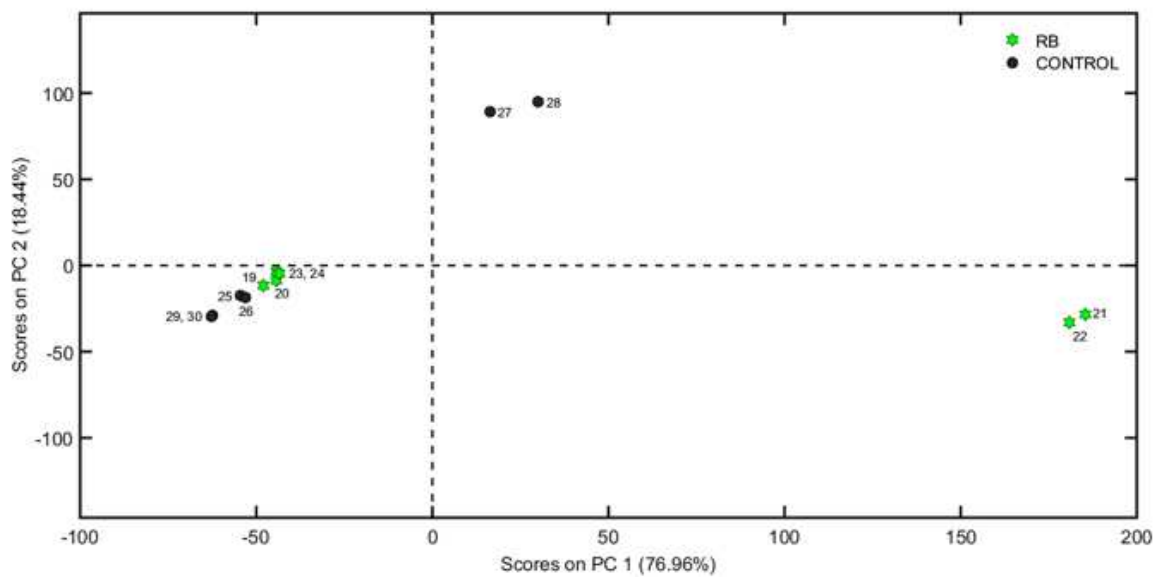
B



C



D

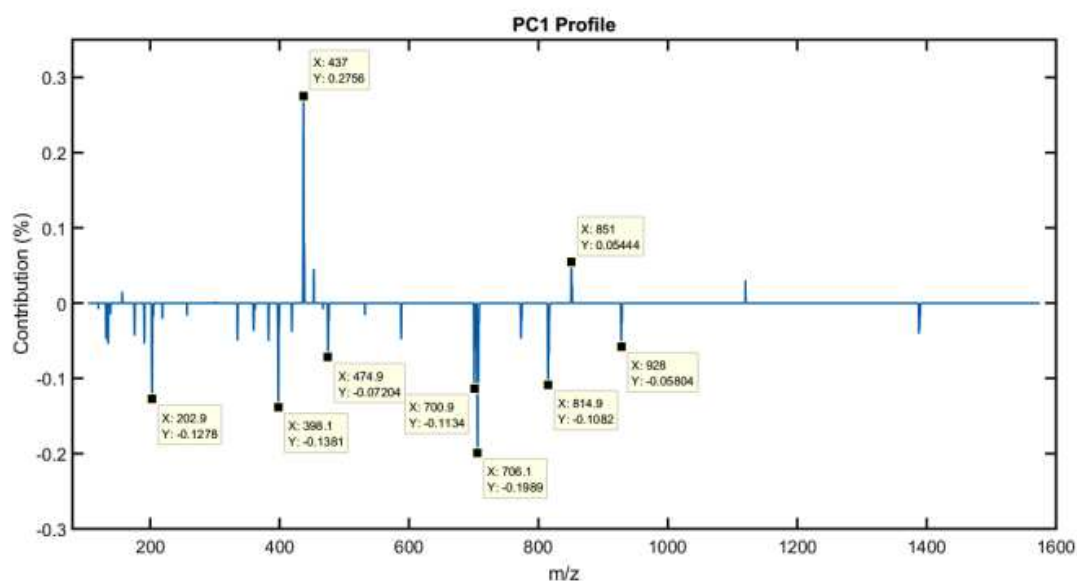


Os modelos A3 e A4 que apresentaram separação parcial e total respectivamente, foram submetidos a análise de quimiometria e foram observados no modo positivo os

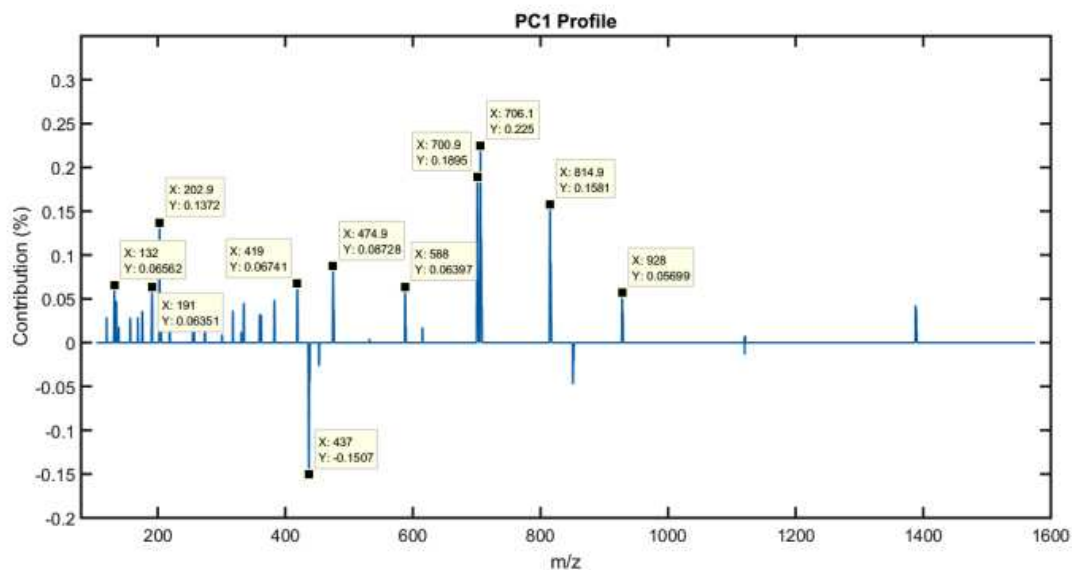
componentes 437 (27%), 706 (22%) e 202 (13%) e nos modelos A3 e A4 em maior porcentagem, onde foram obtidos separação parcial e total respectivamente (Fig. 16).

Figura 16 – Quimiometria nos modelos A3 e A4: Presença em maior porcentagem dos compostos 437, 706 e 202.

Modelo A3



Modelo A4



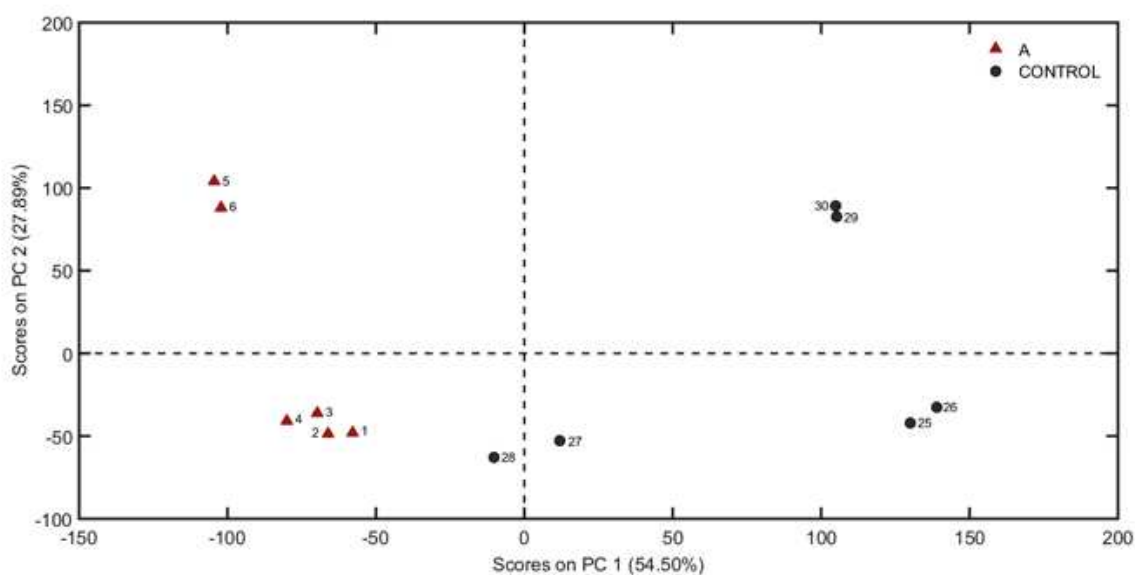
Os compostos identificados no modo positivo são fosfoesnfingolipídios subclasse ceramida fosfoetanolamida. São lipídios estruturais da membrana celular, importantes na sinalização celular, nos processos de regulação do crescimento celular, sobrevivência das células, sistema imune, integridade vascular e epitelial. Devido a subclasse ceramida, esses compostos também desempenham um papel essencial nas inflamações, angiogênese, neurodegeneração e terapia para câncer [50], o que torna importante sua presença após o tratamento das CTM-TAs com os NCs de TiO_2 , pois podem auxiliar no processo de regeneração tecidual.

Modo NEGATIVO:

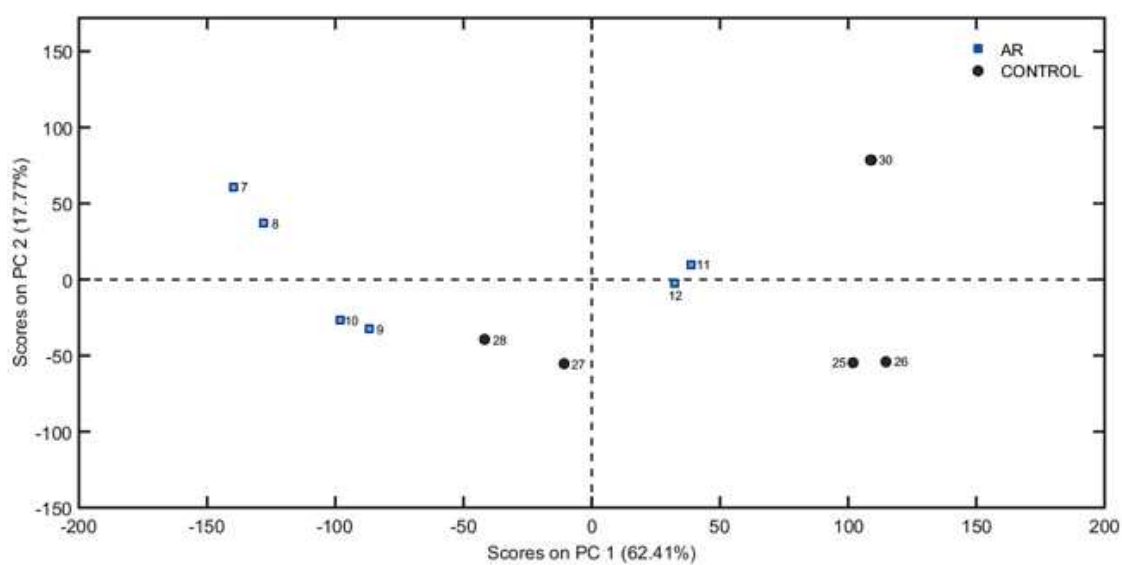
Modelos A4, A3, A1: As PCA's foram construídas usando como pré-processamento o *mean center*, todas com 2 PC's e respectivamente 82,40% (Fig. 17-A); 80,18% (Fig. 17-B) e 86,09% (Fig. 17-C) de variância explicada. O modelo de PCA, (construídos usando a distância euclidiana, o *mean center* como pré-processamento e o Ward's Method como método de ligação), capturaram o mesmo comportamento dos modelos no modo positivo.

Figura 17 – Modelo de PCA's para modo negativo construídos usando a distância euclidiana, o *mean center* como pré-processamento e o Ward's Method como método de ligação. Separação das amostras: **A)** amostra A x controle; **B)** amostra AR x controle e **C)** amostra RB x controle.

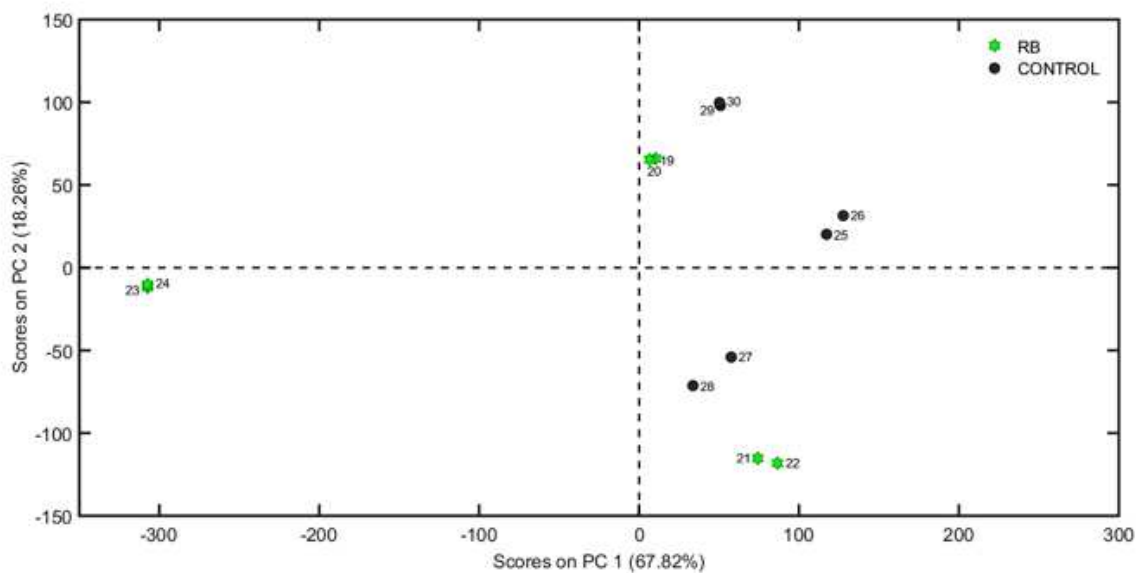
A



B

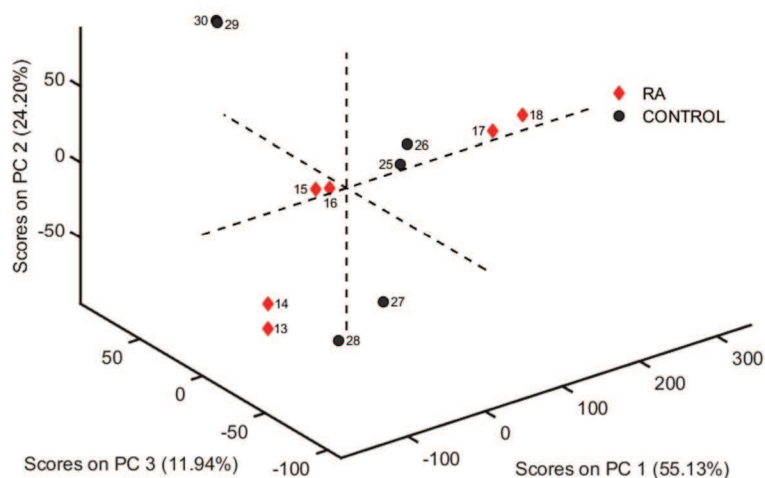


C



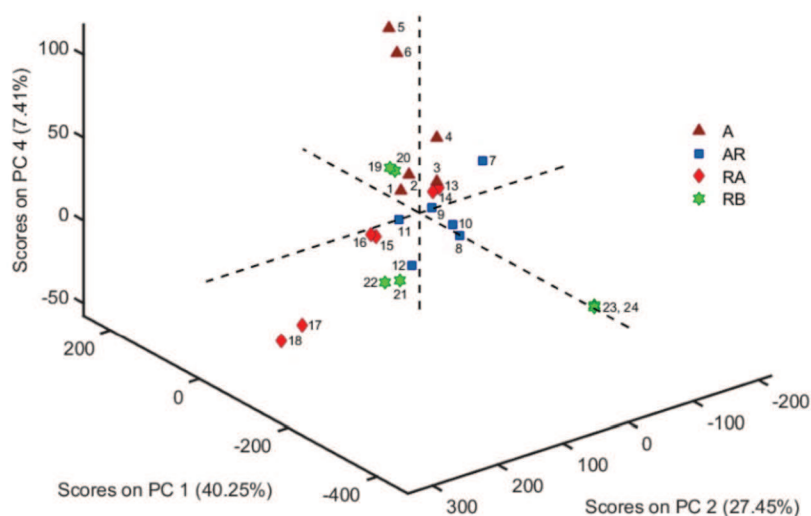
Modelo A2: A PCA usou o *mean center* como pré-processamento e obteve 3 PC's(PC1, PC2 e PC3) com 91,27% de confiança (soma das porcentagens dos 3 PC's). O número maior de PC's comparado ao modo positivo não foi suficiente para separar os grupos RA e Controle (Fig. 18).

Figura 18 – Análise Quimiométrica com a não separação entre a amostra RA e controle.



Modelo A5 (comparação somente entre as amostras: A x AR x RA x RB): Assim como no modo positivo, a PCA foi construída usando o *mean center* como pré-processamento, obteve 4 PC's com 85,67% de variância explicada (comparação entre as amostras em relação aos compostos encontrados). Nele é possível perceber uma distância menor entre as amostras dos grupos A e AR no espaço, o que não é repetido pelas amostras dos outros grupos (Fig. 19).

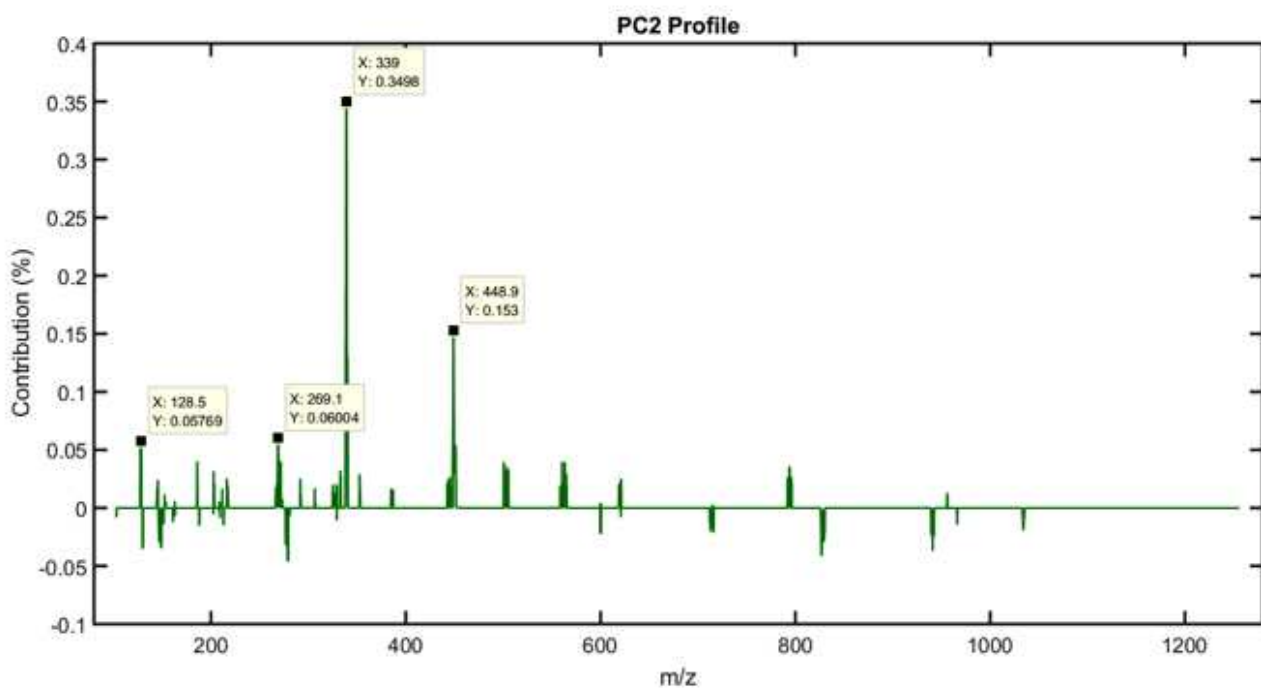
Figura 19 – Análise Quimiométrica: demonstração da menor distância entre as amostras A (modelo A4) e AR (modelo A3).

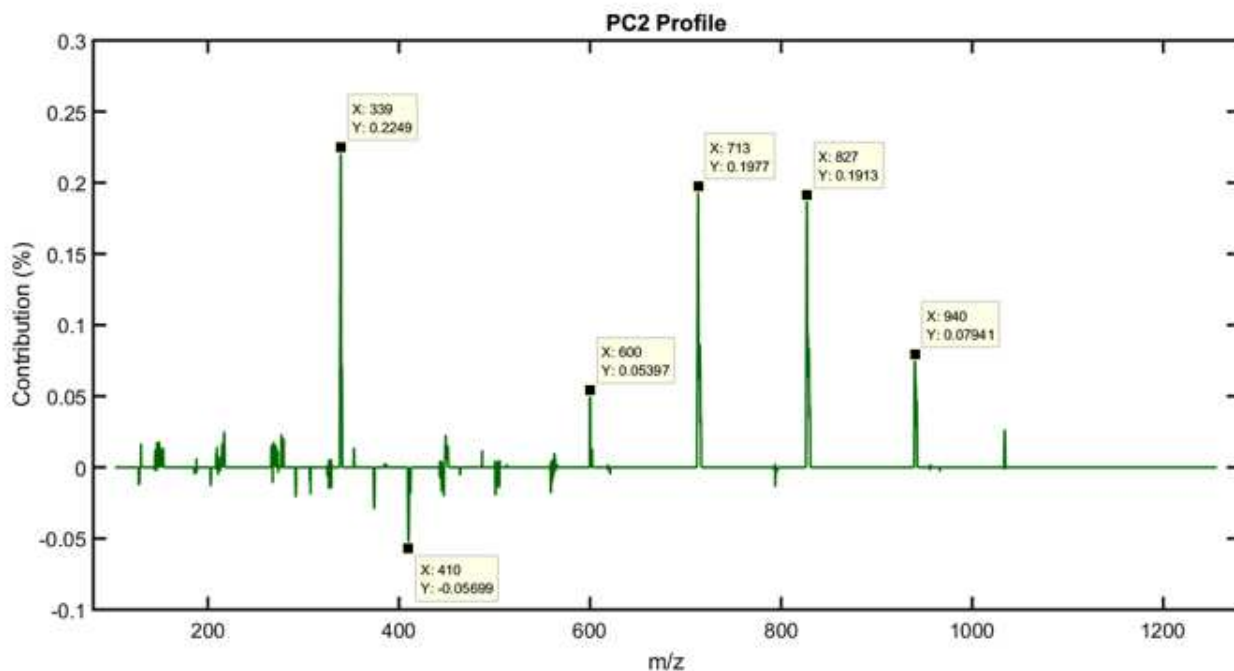


No modo negativo o composto 339 foi encontrado em maior porcentagem também nos modelos A4 e A5 (Fig. 20).

Figura 20 - Presença do metabólito 339 para os modelos A3 (amostra AR) e A4 (amostra A) de NCs de TiO₂ aplicados à CTM-TAs, com uma contribuição de 35% e 22,5%, respectivamente.

Modelo A3





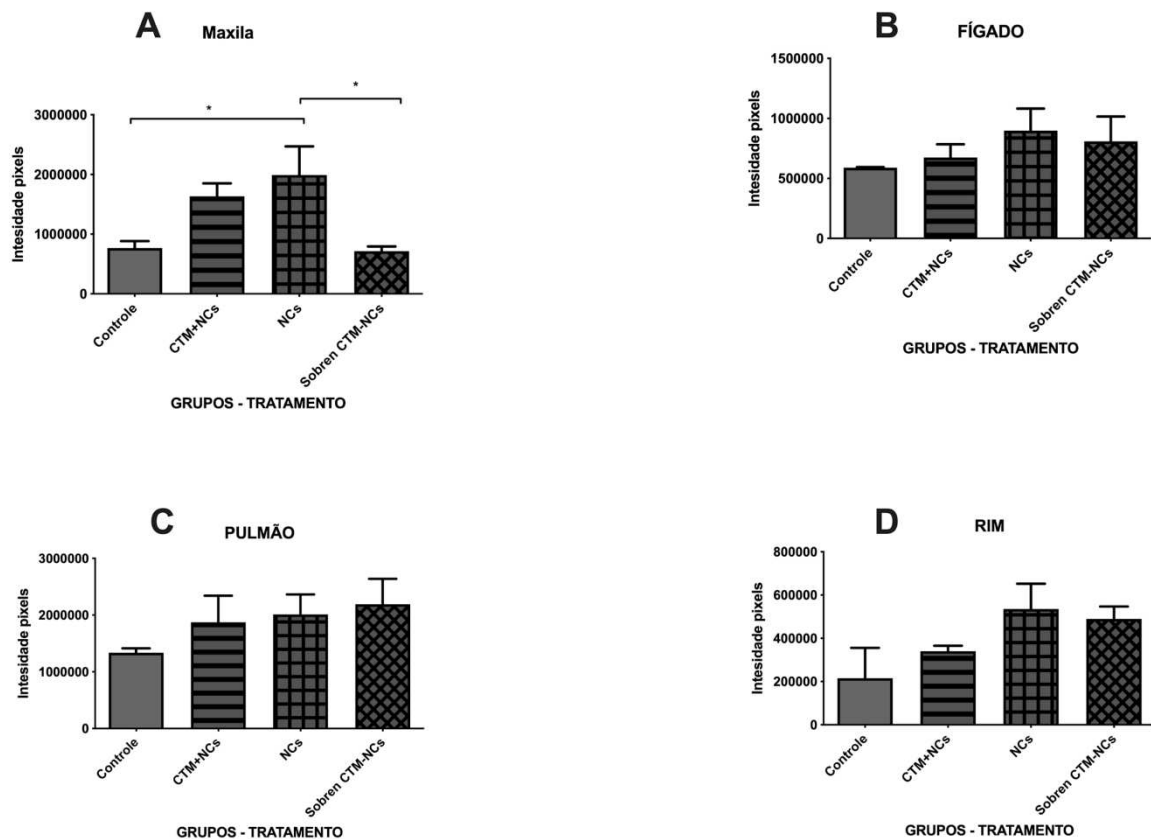
Os metabolitos obtidos na análise do modo positivo e identificados como 437, 706 e 202, bem como o metabolito identificado como 339 obtido da análise do modo negativo foram liberados em maior quantidade pelas CTM-TAs após 24h de tratamento com 200µg de NCs da amostra RB.

4.10 Análise histológica e análise de fluorescência

Para avaliar se os NCs dopados com Eu aplicados na maxila dos ratos se migraram para outro órgão, as imagens de fluorescência foram obtidas dos grupos tratados com NCs de TiO₂. As análises mostraram que os diferentes tratamentos contendo NCs da amostra RB dopada com Európio aplicada na maxila dos ratos apresentaram diferenças estatísticas quanto a intensidade de fluorescência quando comparadas ao grupo controle e ao grupo tratado com sobrenadante dos NCs. O grupo com tratamento contendo apenas os NCs foi o que obteve maior fluorescência, acima de 2 milhões de pixels (Fig. 21-A), assim como no fígado porém com fluorescência menor que 1 milhão de pixels (Fig. 21-B). No pulmão não foi observada diferença entre o

controle e os tratamentos, estando a fluorescência entre os grupos em torno de 2 milhões de pixels (Fig, 21-C). No rim o grupo tratado com NCs foi o que obteve maior fluorescência (Fig. 21-D), mas não apresentou diferença estatística entre os outros tratamentos.

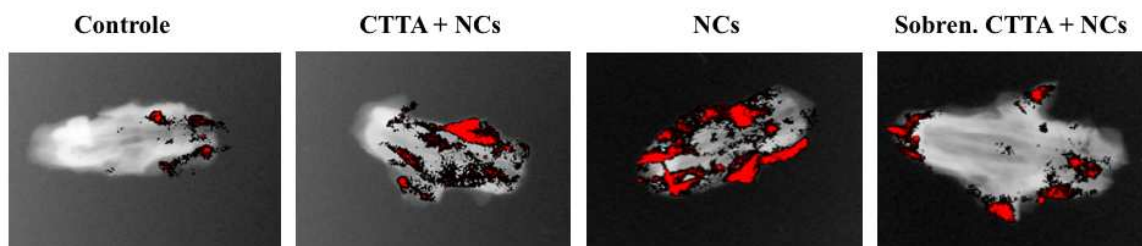
Figura 21 – Análise da intensidade de fluorescência nos diferentes órgãos dos ratos após aplicação de CTM-TAs e/ou NCs da amostra RB dopados com Európio na concentração de 50µg/ml. **A)** Intensidade de Fluorescência obtida na Maxila de ratos; **B)** Intensidade de Fluorescência obtida no Fígado; **C)** Intensidade de Fluorescência obtida no Pulmão; **D)** Intensidade de Fluorescência obtida no rim.



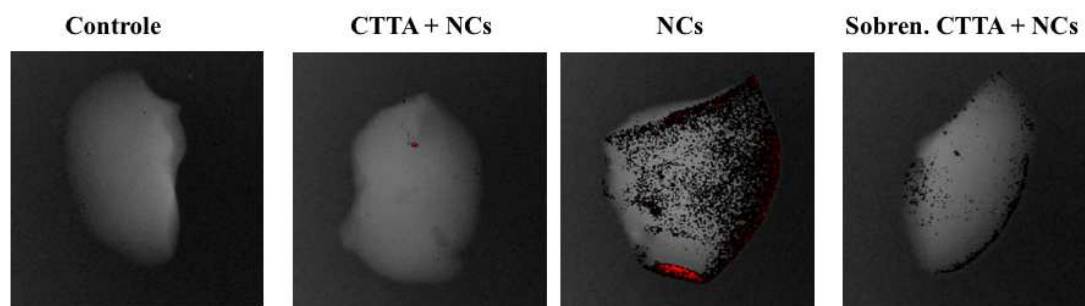
Os resultados também podem ser visualizados pelas imagens abaixo das peças anatômicas:

Figura 22 – Imagens da intensidade de fluorescência nos diferentes órgãos dos ratos após aplicação de CTM-TAs e/ou NCs da amostra RB dopados com Európio na concentração de 50µg/ml. **A)** Maxila; **B)** Fígado; **C)** Pulmão; **D)** rim.

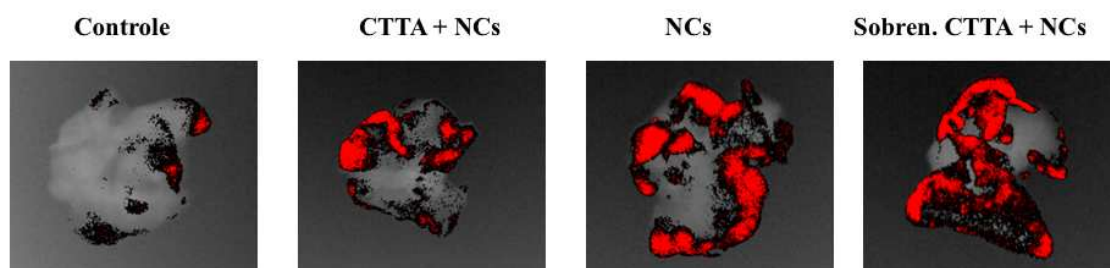
A



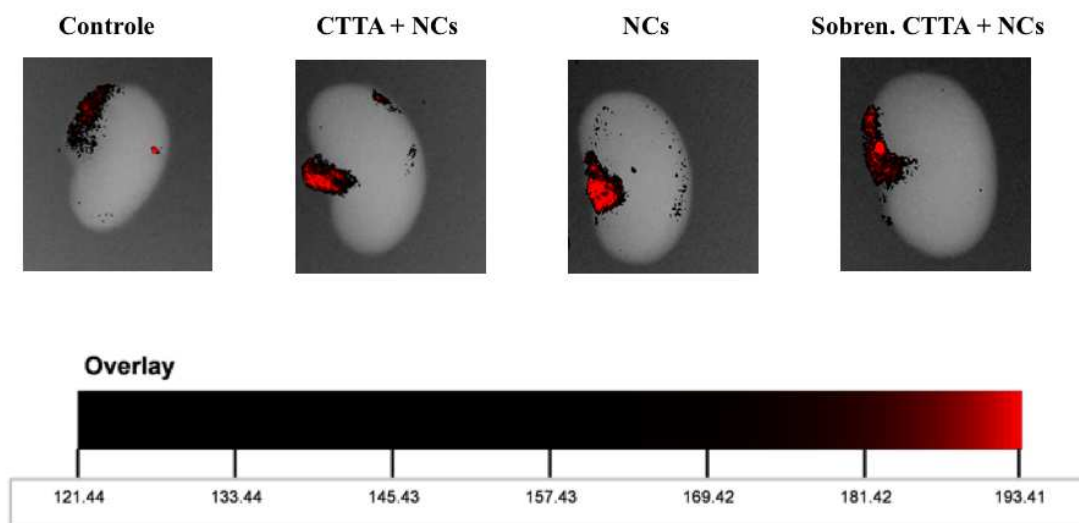
B



C



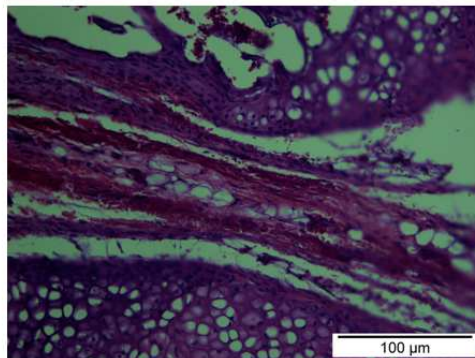
D



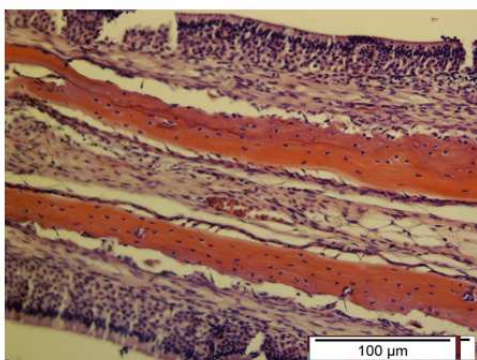
A análise histológica foi realizada próximo das fossas nasais e mostrou que não ocorreu alteração em comparação ao grupo controle. Os animais que receberam os diferentes tratamentos na região da papila incisiva mostraram aspectos histológicos similares ao grupo controle e ao grupo sem tratamento, ou seja, sem infiltrado inflamatório e com fibras colágenas organizadas, sem alteração em relação aos vasos sanguíneos (Fig. 23).

Figura 23 – Cortes histológicos próximo das fossas nasais dos ratos nos diferentes tratamentos onde não foi verificada alteração entre os grupos. **Grupo I:** controle; **Grupo II:** células-tronco mesenquimais associadas a 50µg/mL de NCs da amostra RB; **Grupo III:** 50µg/ml de NCs da amostra RB diluída em PBS; **Grupo IV:** sobrenadante das células-tronco mesenquimais associadas a 50µg/mL de NCs da amostra RB. **Grupo V:** sem tratamento.

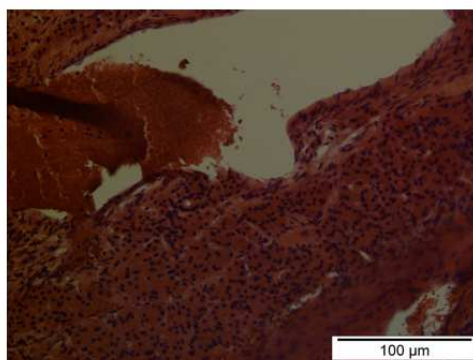
Grupo I - Controle



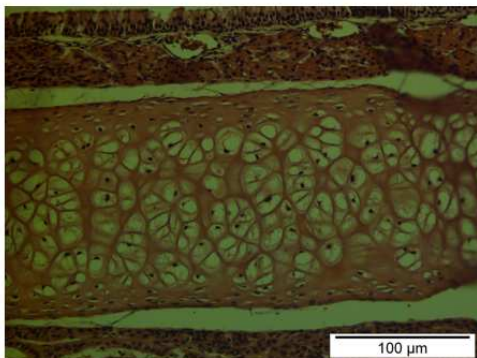
Grupo II - CTTA



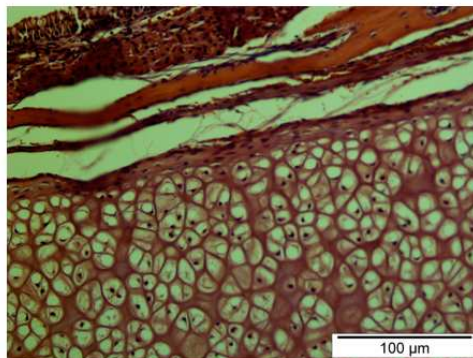
Grupo III – NCs



Grupo IV – Sobrenadante NCs
+ CTTA



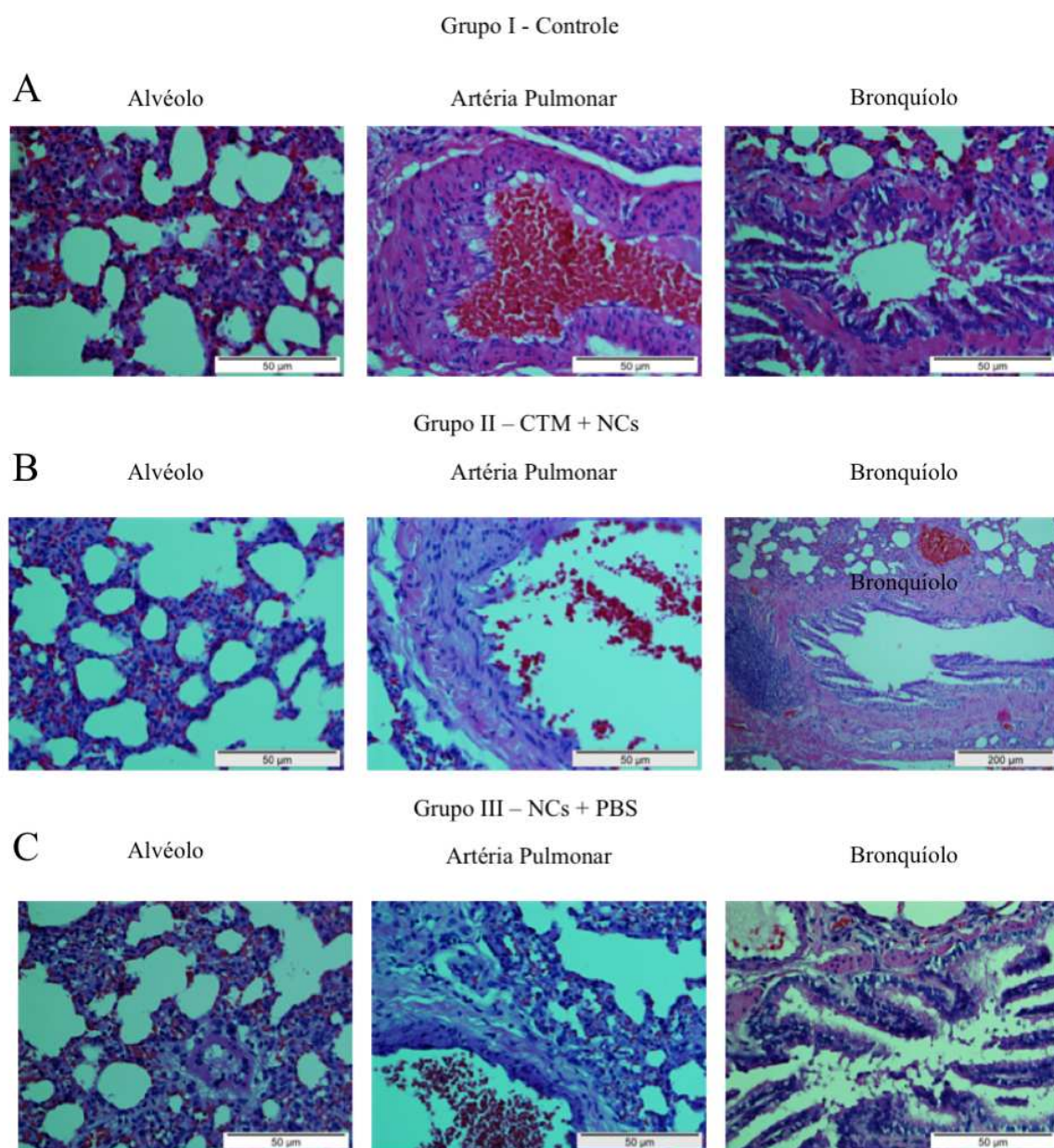
Grupo V – Sem tratamento



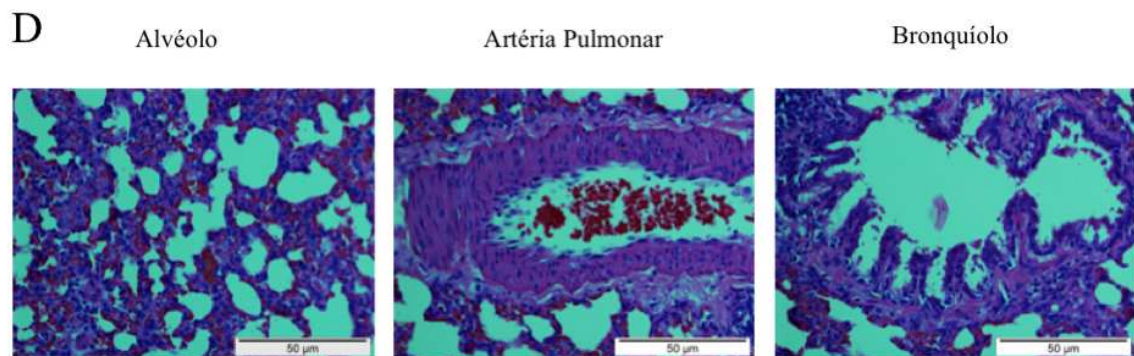
Após análise histológica nos alvéolos, bronquíolos e artéria pulmonar observou-se que em nenhum dos grupos foi apresentado focos fibroblásticos e nem fibrose intersticial, conforme figura 23.

Figura 24 - Avaliação histológica de alvéolo, artéria pulmonar e bronquíolos dos grupos: **Grupo I:** controle; **Grupo II:** células-tronco mesenquimais associadas a 50μg/mL de NCs da amostra RB; **Grupo**

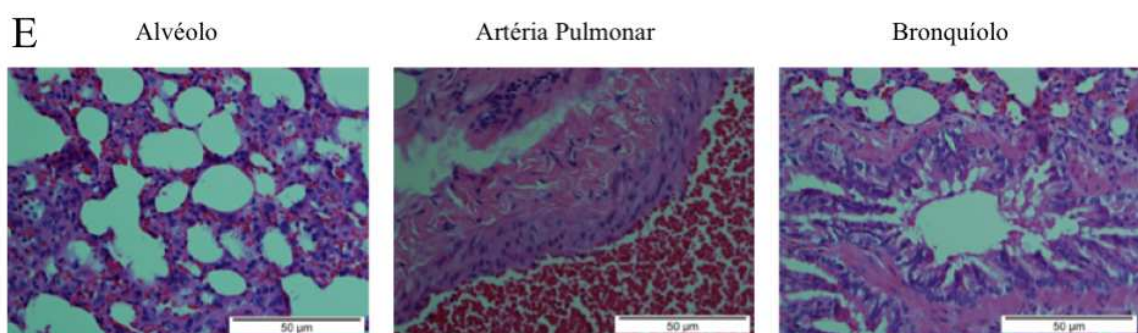
III: 50µg/ml de NCs da amostra RB diluída em PBS; **Grupo IV:** sobrenadante das células-tronco mesenquimais associadas a 50µg/mL de NCs da amostra RB. **Grupo V:** sem tratamento.



Grupo VI – Sobrenadante CTM +NCs



Grupo V – Sem tratamento



5 DISCUSSÃO

A Nanobiotecnologia é considerada a única fusão de biotecnologia e nanotecnologia pela qual a microtecnologia clássica pode ser incorporada a uma abordagem biológica molecular real. Essa nova união científica pode facilitar a pesquisa, integrando aplicações tecnológicas de ponta e nanotecnologia em questões biológicas contemporâneas [51]. Com estas perspectivas, se torna importante a utilização de nanopartículas no viés biológico. Por este motivo, esse trabalho teve como objetivo avaliar os diferentes NCs de TiO_2 , sintetizados pelo Instituto da Física da UFU para uso na bioengenharia tecidual, quanto ao seu potencial de aglomeração, viabilidade celular, internalização celular, migração celular e produção de metabólitos em ensaios *in vitro*. Após a escolha da melhor amostra de nanocristal, os ensaios *in vivo* foram realizados para avaliar seu comportamento quanto a localização em diferentes órgãos.

Diversos estudos, “*in vitro*” e “*in vivo*”, têm mostrado resultados promissores no beneficiamento da medicina regenerativa utilizando a terapia celular associada aos biomateriais. Independentemente da metodologia para a síntese/fabricação do

biomaterial, devem ser consideradas características biológicas bem aceitas como viabilidade celular (citotoxicidade), capacidade de migração e alteração tecidual. Um controle rigoroso sobre esses aspectos é uma ferramenta poderosa para modular o destino celular, orientando o comportamento e a resposta celular *in vitro* e *in vivo*. Na regeneração de um tecido danificado é necessário que o local da injúria forneça suporte à migração, proliferação e diferenciação de células indiferenciadas[52].

O ensaio do DLS foi importante para determinar a estabilidade dos aglomerados dos NCs quando dispersos em diferentes soluções. As suas propriedades físico-químicas podem tornar-se muito diferentes das propriedades dos mesmos materiais com diferentes dimensões. Assim, pode-se dizer que as propriedades dos nanomateriais de uma determinada substância dependem também do tamanho, pois determinam seu comportamento, podendo ser totalmente diferente, como se tratasse de uma nova substância [53], principalmente quando na presença ou ausência de soro, pois ele modula a eficiência de internalização e os efeitos adversos dessas NPs [54]. Os resultados referentes a amostra RB se destacaram porque os seus aglomerados dispersos em meio completo (DMEM+BSA+SFB) apresentaram uma maior estabilidade, o que é extremamente importante na sua associação às CTM-TAs com finalidades terapêuticas. Em outros trabalhos ao preparar os NCs adicionado ao BSA observou-se a estabilidade no tamanho dos aglomerados, comprovados pela análise de DLS [44, 55].

Quanto a viabilidade celular, em alguns estudos, a forma anatase promoveu maiores danos celulares com alterações morfológicas severas, como: ruptura dos filamentos de actina e da membrana celular [56]. O Comitê de Avaliação de Risco (RAC) da Agência Europeia de Produtos Químicos (ECHA) concluiu, em junho de 2017, que o TiO₂ (em todas as suas formas) deve ser classificado como suspeito de ser cancerígeno humano (categoria 2) por inalação [57]. Porém, nossos resultados mostraram que a metodologia utilizada para a síntese e preparo dos NCs não promoveram nenhuma redução da viabilidade das CTM-TAs, pois a adição de peptídeos, proteínas e macromoléculas nos meios (por exemplo, albumina sérica bovina - BSA ou soro fetal bovino - SFB) indicam que os NCs se mantêm em um estado disperso estável, o que também pode facilitar o contato com as células [57].

Em estudos de genotoxicidade *in vitro* realizados com NPs de TiO₂, os pesquisadores utilizaram vários tempos de incubação, variando geralmente de 1 a mais de 24 horas e nenhuma resposta genotóxica dependente do tempo foi identificada [58].

Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos nesse estudo, onde os NCs da amostra RB tiveram um comportamento padrão de internalização pelo ensaio de localização, pois quanto maior a concentração dos NCs, maior quantidade de NCs foram detectados no citoplasma das células e sua presença não foi observada no núcleo.

Em um levantamento de estudos com NCs foi verificado que não há nenhuma pesquisa com a forma RB (rutilo-brookita), por isso há a necessidade de mais pesquisas deste nanocristal, já que essa combinação foi a que apresentou melhores resultados *in vitro* nesse estudo.

O ensaio de *wound healing* (cicatrização de feridas) é particularmente adequado para estudos de migração direcional de células e sua regulação por interação celular com matriz extracelular (MEC) e interações célula-célula. [59, 60], envolve interações dinâmicas entre vários tipos de células, com moléculas da matriz extracelular e produção regulada de mediadores solúveis e citocinas [61]. A utilização do NC RB, na concentração de 50 µg/ml, aumentou a migração das CTM-TAs após 24 horas, o que sugere que esses NCs estimulam a secreção de fatores que podem facilitar a migração dessas células para o tecido alvo, podendo ser um componente essencial no desenvolvimento de terapêuticas aprimoradas para a regeneração tecidual.

O estudo da utilização de NCs de TiO₂ associados a CTM-TA com objetivo de regeneração óssea é extremamente importante, pois pode gerar tratamentos mais eficazes, além disso alguns estudos já demonstraram um alto potencial para o *design* de novos biomateriais e *scaffolds* com base na anatomia do osso [62].

A metabolômica tem ocupado um lugar importante na bioanálise e na investigação biomédica nos últimos anos, posicionando-se como a mais recente das tecnologias “ômicas” [63]. Na análise de espectrometria de massa foi encontrado no modo positivo os componentes 437, 706 e 202 e no modo negativo o componente 339, ambos nas amostras A e AR.

A identificação dos metabólitos fosfoenfolipídios subclasse ceramida fosfoetanolamida demonstrou que os NCs estimulam a produção de substâncias importantes para a sobrevivência e proliferação celular.

A produção de substâncias análogas às bases esfingóides pode levar a novos agentes antibacterianos, antifúngicos, anticâncer, anti-inflamatórios, imunossupressores, entre outros. Sabendo que as CTM-TAs tratadas com NCs de TiO₂ produzem esses metabólitos, essa informação abre novas perspectivas para a aplicação

destes NCs, podendo ser futuramente utilizados como agentes antibacterianos, antifúngicos, anticâncer, anti-inflamatórios, imunossupressores, entre outros.

Já foi verificado que a maioria das células inoculadas por via intravenosa foram encontradas localizadas nos pulmões, sugerindo o aprisionamento celular nesse órgão e sendo um fator limitante para a entrega de células [64].

Nesse estudo, com a aplicação local de CTM-TAs não foi observado nenhum aprisionamento destas células no pulmão, rim ou fígado pelas imagens de fluorescência, mas sim restrita ao local da aplicação (maxila), como foi verificado pelas imagens de fluorescência, apresentando redução de efeitos secundários.

Os nanomateriais, para fins de regeneração, podem ser aplicados localmente sendo utilizados como material de enchimento ou como revestimentos de superfícies, sozinhos ou associados a células-tronco. Esses biomateriais podem influenciar o comportamento celular direcionando e induzindo diversos processos celulares, como o aumento da migração celular encontrado nesse estudo, que pode potencializar uma terapia celular, por facilitar a migração de células ao tecido alvo.

6 CONCLUSÃO

Os NCs de TiO₂ das diferentes amostras (A, AR, RA e RB) e concentrações (5, 50, 100 e 200 µg) não reduziram a viabilidade das CTM-TAs, apresentaram localização citoplasmática e dispersão estável, bem como aumentaram a migração das CTM-TAs, o que pode auxiliar em uma terapia celular na medicina regenerativa. Além disso, as CTM-TAs associadas aos NCs de TiO₂ liberam metabólitos identificados como fosfoenfolipídios subclasse ceramida fosfoetanolamida, que são fundamentais para a sobrevivência e proliferação celular, bem como em processos inflamatórios e angiogênese.

Perspectivas Futuras

Identificação dos metabólitos para melhor compreensão do mecanismo de ação dos NCs, bem como novos estudos destes NCs talvez incluídos em alguma estrutura ou *scaffolds*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oliveira, A.A.R.d., et al., *Avaliação das propriedades mecânicas de espumas híbridas de vidro bioativo/álcool polivinílico para aplicação em engenharia de tecidos*. Matéria (Rio de Janeiro), 2007. **12**: p. 140-149. <https://doi.org/10.1590/S1517-70762007000100018>
2. Oryan, A., et al., *Comparative study on the role of gelatin, chitosan and their combination as tissue engineered scaffolds on healing and regeneration of critical sized bone defects: an in vivo study*. J Mater Sci Mater Med, 2016. **27**(10): p. 155. <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5766-6> PMID:27590825.
3. Navaei, A., et al., *Gold nanorod-incorporated gelatin-based conductive hydrogels for engineering cardiac tissue constructs*. Acta Biomater, 2016. **41**: p. 133-46. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.05.027> PMID:27212425.
4. Shi, M., Z.W. Liu, and F.S. Wang, *Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells*. Clinical and experimental immunology, 2011. **164**(1): p. 1-8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04327.x> PMID:21352202 PMCID:PMC3074211
5. Till, J.E., E.A. McCulloch, and L. Siminovitch, *A STOCHASTIC MODEL OF STEM CELL PROLIFERATION, BASED ON THE GROWTH OF SPLEEN COLONY-FORMING CELLS*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1964. **51**(1): p. 29-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.1.29> PMID:14104600 PMCID:PMC300599
6. Drzewiecki, B.A., J.C. Thomas, and S.T. Tanaka, *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: current and future applications in the urinary bladder*. Stem Cells Int, 2011. **2010**: p. 765167. <https://doi.org/10.4061/2010/765167> PMID:21253479 PMCID:PMC3022195
7. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, and K.S. Lalykina, *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. Cell Tissue Kinet, 1970. **3**(4): p. 393-403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x> PMID:5523063
8. Morrison, S.J., N.M. Shah, and D.J. Anderson, *Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology*. Cell, 1997. **88**(3): p. 287-298. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81867-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81867-X)
9. Vogel, G., *Can Old Cells Learn New Tricks?* Science, 2000. **287**(5457): p. 1418. <https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1418> PMID:10722390
10. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145> PMID:9804556
11. van Inzen, W.G., et al., *Neuronal differentiation of embryonic stem cells*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1312**(1): p. 21-6. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(96\)00011-0](https://doi.org/10.1016/0167-4889(96)00011-0)
12. Odorico, J.S., D.S. Kaufman, and J.A. Thomson, *Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines*. Stem Cells, 2001. **19**(3): p. 193-204. <https://doi.org/10.1634/stemcells.19-3-193> PMID:11359944
13. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-50. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504> PMID:1870029
14. Kraus, K.H. and C. Kirker-Head, *Mesenchymal stem cells and bone regeneration*. Vet Surg, 2006. **35**(3): p. 232-42. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2006.00142.x> PMID:16635002
15. Sobhani, A., et al., *Multipotent Stem Cell and Current Application*. Acta Med Iran, 2017. **55**(1): p. 6-23. PMID: 28188938
16. Robey, P.G., *Stem cells near the century mark*. J Clin Invest, 2000. **105**(11): p. 1489-91. <https://doi.org/10.1172/JCI10256> PMID:10841501 PMCID:PMC300867
17. Gage, F.H., *Mammalian neural stem cells*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1433-8. <https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1433> PMID:10688783
18. Gargett, C.E. and H. Masuda, *Adult stem cells in the endometrium*. Mol Hum Reprod, 2010. **16**(11): p. 818-34. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq061> PMID:20627991

19. Kern, S., et al., *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue*. Stem Cells, 2006. **24**(5): p. 1294-301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342> PMID:16410387
20. Mizuno, H. and H. Hyakusoku, *Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells*. J Nippon Med Sch, 2003. **70**(4): p. 300-6. <https://doi.org/10.1272/jnms.70.300> PMID:12928709
21. Levi, B. and M.T. Longaker, *Concise review: adipose-derived stromal cells for skeletal regenerative medicine*. Stem cells (Dayton, Ohio), 2011. **29**(4): p. 576-582. <https://doi.org/10.1002/stem.612> PMID:21305671 PMCID:PMC3323288
22. Shoji, T., et al., *Local transplantation of human multipotent adipose-derived stem cells accelerates fracture healing via enhanced osteogenesis and angiogenesis*. Laboratory Investigation, 2010. **90**(4): p. 637-649. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.39> PMID:20157290
23. Mastrolia, I., et al., *Concise Review: Challenges in Clinical Development of Mesenchymal Stromal/Stem Cells*. Stem Cells Transl Med, 2019. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0044> PMID:31313507 PMCID:PMC6811694
24. Bourin, P., et al., *Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT)*. Cytotherapy, 2013. **15**(6): p. 641-8. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006> PMID:23570660 PMCID:PMC3979435
25. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905> PMID:16923606
26. Philipponnet, C., et al., *Ischemia reperfusion injury in kidney transplantation: A case report*. Medicine (Baltimore), 2018. **97**(52): p. e13650. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013650> PMID:30593134 PMCID:PMC6314654
27. Gong, T., et al., *Nanomaterials and bone regeneration*. Bone Research, 2015. **3**: p. 15029. <https://doi.org/10.1038/boneres.2015.29> PMID:26558141 PMCID:PMC4639780
28. Clavijo, V.G., et al., *Fracture strength of flared bovine roots restored with different intraradicular posts*. J Appl Oral Sci, 2009. **17**(6): p. 574-8. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572009000600007> PMID:20027429 PMCID:PMC4327516
29. Vijay Bhooshan, K., et al., *Silver and gold doped hydroxyapatite nanocomposites for enhanced bone regeneration*. Biomedical Materials, 2019. PMID: 31185462 DOI: 10.1088/1748-605X/ab28e4
30. Zhou, Y.L., Z.J. Ding, and L. Tang, *[Effect of surface roughness and titanium dioxide layers on commercially pure titanium on attachment of osteoblasts]*. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 2011. **29**(1): p. 13-6. PMID: 21427892
31. Moellmann, J., et al., *A DFT-D study of structural and energetic properties of TiO₂ modifications*. J Phys Condens Matter, 2012. **24**(42): p. 424206. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/24/42/424206> PMID:23032480
32. DIAS, T.S., *Modificações de TiO₂ com Hidrogênio para uso em Células Solares Fotovoltaica*. 2018.
33. Kim, S.E., et al., *Anodically nanostructured titanium oxides for implant applications*. Electrochimica Acta, 2008. **53**(14): p. 4846-4851. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.02.005>
34. Textor, M., et al., *Properties and Biological Significance of Natural Oxide Films on Titanium and Its Alloys*, in *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications*. 2001, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 171-230. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56486-4_7
35. Jokinen, M., et al., *Influence of sol and surface properties on in vitro bioactivity of sol-gel-derived TiO₂ and TiO₂-SiO₂ films deposited by dip-coating method*. J Biomed Mater Res, 1998. **42**(2): p. 295-302. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199811\)42:2<295::AID-JBM15>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199811)42:2<295::AID-JBM15>3.0.CO;2-I)

36. López-Huerta, F., et al., *Biocompatibility and Surface Properties of TiO₂ Thin Films Deposited by DC Magnetron Sputtering*. Materials (Basel, Switzerland), 2014. **7**(6): p. 4105-4117. <https://doi.org/10.3390/ma7064105> PMid:28788667 PMCID:PMC5455933
37. Ferin, J., G. Oberdorster, and D.P. Penney, *Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1992. **6**(5): p. 535-42. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb/6.5.535> PMid:1581076
38. Hong, S.H., et al., *Stem cell passage affects directional migration of stem cells in electrotaxis*. Stem Cell Research, 2019. **38**: p. 101475. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101475> PMid:31176110
39. Han, G., et al., *Nitric oxide-releasing nanoparticles accelerate wound healing by promoting fibroblast migration and collagen deposition*. Am J Pathol, 2012. **180**(4): p. 1465-73. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.12.013> PMid:22306734
40. Saghatelian, A. and B.F. Cravatt, *Global strategies to integrate the proteome and metabolome*. Current Opinion in Chemical Biology, 2005. **9**(1): p. 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.12.004> PMid:15701455
41. Sumner, L.W., P. Mendes, and R.A. Dixon, *Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era*. Phytochemistry, 2003. **62**(6): p. 817-36. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00708-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00708-2)
42. Fakruddin, M., Z. Hossain, and H. Afroz, *Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective*. Journal of Nanobiotechnology, 2012. **10**(1): p. 31. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-10-31> PMid:22817658 PMCID:PMC3422163
43. Ohtani, B., et al., *What is Degussa (Evonik) P25? Crystalline composition analysis, reconstruction from isolated pure particles and photocatalytic activity test*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2010. **216**(2): p. 179-182. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2010.07.024>
44. Taurozzi, J.S., V.A. Hackley, and M.R. Wiesner, *A standardised approach for the dispersion of titanium dioxide nanoparticles in biological media*. Nanotoxicology, 2013. **7**(4): p. 389-401. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.665506> PMid:22397515
45. Park, J.H., et al., *Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of a Natural Compound, Shizukahenriol, through Nrf2 Activation*. Molecules, 2015. **20**(9): p. 15989-6003. <https://doi.org/10.3390/molecules200915989> PMid:26364630 PMCID:PMC6332350
46. Leary, S., *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition*. Vol. <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>. 2013.
47. Gaynor, A.G., et al., *Characterization of nanophase titania particles synthesized using in situ steric stabilization*. Vol. 12. 1997. 1755-1765. <https://doi.org/10.1557/JMR.1997.0242>
48. Zhang, L. and S.L. Kosaraju, *Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants*. European Polymer Journal, 2007. **43**(7): p. 2956-2966. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.04.033>
49. Reis Ede, M., et al., *Evaluation of titanium dioxide nanocrystal-induced genotoxicity by the cytokinesis-block micronucleus assay and the Drosophila wing spot test*. Food Chem Toxicol, 2016. **96**: p. 309-19. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.023> PMid:27562929
50. Holland, W.L., et al., *Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin*. Nat Med, 2011. **17**(1): p. 55-63. <https://doi.org/10.1038/nm.2277> <https://doi.org/10.1038/75596>
51. Fakruddin, M., Z. Hossain, and H. Afroz, *Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective*. J Nanobiotechnology, 2012. **10**: p. 31. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-10-31> PMid:22817658 PMCID:PMC3422163
52. Zhang, W.J., et al., *Tissue engineering of blood vessel*. J Cell Mol Med, 2007. **11**(5): p. 945-57. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00099.x> PMid:17979876 PMCID:PMC4401266
53. Stucchi, M., et al., *Ultrasound assisted synthesis of Ag-decorated TiO₂ active in visible light*. Ultrason Sonochem, 2018. **40**(Pt A): p. 282-288. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.07.016> PMid:28946426

54. Sharma, S., et al., *Fueling a Hot Debate on the Application of TiO₂ Nanoparticles in Sunscreen*. Materials (Basel), 2019. **12**(14). <https://doi.org/10.3390/ma12142317> PMid:31330764 PMCID:PMC6678326
55. Shull, T.E., J. Kurepa, and J.A. Smalle, *Anatase TiO₂ Nanoparticles Induce Autophagy and Chloroplast Degradation in Thale Cress (Arabidopsis thaliana)*. Environ Sci Technol, 2019. **53**(16): p. 9522-9532. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01648> PMid:31356742
56. Gerloff, K., et al., *Distinctive toxicity of TiO₂ rutile/anatase mixed phase nanoparticles on Caco-2 cells*. Chem Res Toxicol, 2012. **25**(3): p. 646-55. <https://doi.org/10.1021/tx200334k> PMid:22263745
57. Charles, S., et al., *Assessment of the in vitro genotoxicity of TiO₂ nanoparticles in a regulatory context*. Nanotoxicology, 2018. **12**(4): p. 357-374. <https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1451567> PMid:29553842
58. Carriere, M., et al., *Impact of nanoparticles on DNA repair processes: current knowledge and working hypotheses*. Mutagenesis, 2017. **32**(1): p. 203-213. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew052> PMid:27794034
59. Han, D.C., L.G. Rodriguez, and J.L. Guan, *Identification of a novel interaction between integrin beta1 and 14-3-3beta*. Oncogene, 2001. **20**(3): p. 346-57. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204068> PMid:11313964
60. Lipton, A., et al., *Migration of mouse 3T3 fibroblasts in response to a serum factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(11): p. 2799-801. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.11.2799> PMid:5288259 PMCID:PMC389528
61. Grada, A., et al., *Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay*. Journal of Investigative Dermatology, 2017. **137**(2): p. e11-e16. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020> PMid:28110712
62. Oliveira, S.M., R.L. Reis, and J.F. Mano, *Towards the design of 3D multiscale instructive tissue engineering constructs: Current approaches and trends*. Biotechnol Adv, 2015. **33**(6 Pt 1): p. 842-55. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.007> PMid:26025038
63. Playdon, M.C., et al., *Metabolomics Analytics Workflow for Epidemiological Research: Perspectives from the Consortium of Metabolomics Studies (COMETS)*. Metabolites, 2019. **9**(7): p. 145. <https://doi.org/10.3390/metabo9070145> PMid:31319517 PMCID:PMC6681081
64. Assis, A.C., et al., *Time-dependent migration of systemically delivered bone marrow mesenchymal stem cells to the infarcted heart*. Cell Transplant, 2010. **19**(2): p. 219-30. <https://doi.org/10.3727/096368909X479677> PMid:19906330