

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação da viabilidade, proliferação e migração das células-tronco mesenquimais de
cães na presença de nanopartículas de Dióxido de Titânio

Bianca Lourenço de Oliveira Souza

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de
Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia

MG

Junho - 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação da viabilidade, proliferação e migração das células-tronco mesenquimais de
cão na presença de nanopartículas de Dióxido de Titânio

Bianca Lourenço de Oliveira Souza

Prof.^a Dr.^a. Vivian Alonso-Goulart

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de
Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção
do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Junho 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação da viabilidade, proliferação e migração das células-tronco mesenquimais de
cão na presença de nanopartículas de Dióxido de Titânio

Bianca Lourenço de Oliveira Souza

Prof.^a Dr.^a. Vivian Alonso-Goulart

Instituto de Biotecnologia

Homologado pela coordenação do
Curso de Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr. Nilson Nicolau Júnior

Uberlândia – MG

Junho 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação da viabilidade, proliferação e migração das células-tronco mesenquimais de
cão na presença de nanopartículas de Dióxido de Titânio

Bianca Lourenço de Oliveira Souza

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Prof.^a. Dr.^a. Vivian Alonso Goulart

Uberlândia, 30 de junho de 2023

RESUMO

Os cães estão sujeitos a fraturas ósseas, principalmente em membros como o fêmur, tibia-fíbula e úmero. A medicina regenerativa, que busca a regeneração de tecidos e órgãos disfuncionais, tem sido frequentemente estudada como tratamento de fraturas ósseas caninas. Pesquisadores estão explorando técnicas dessa área, como terapia celular e engenharia de tecidos, que utilizam células-tronco, nanopartículas, entre outros elementos, para promover a regeneração dos tecidos. O foco deste trabalho foi explorar a associação das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo canino (CTM-TA), que são capazes de se diferenciar em outros tipos de células, agindo como um sistema de reparo para o corpo com nanopartículas de Dióxido de Titânio (NCs TiO_2), que possuem excelente biocompatibilidade, alta estabilidade química e baixa toxicidade. Primeiramente, foi feito o isolamento e a caracterização das CTMs, a síntese dos NCs de TiO_2 e em seguida foram realizados ensaios de viabilidade, proliferação e migração celular o teste de dispersão e por fim foi realizado o ensaio de migração celular. Nos testes de viabilidade celular, em ambas as concentrações das NCs, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, não houve citotoxicidade. Em relação a proliferação, no terceiro dia, houve aumento com os tratamentos em relação ao controle, porém no quinto dia proliferação celular se manteve próxima ao do controle. A migração também apresentou bons resultados, com maior percentual de fechamento da ranhura em relação ao controle.

Palavras-chave: células-tronco, nanopartículas, dióxido de titânio , migração, viabilidade e proliferação.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Fraturas ósseas em cães.....	1
1.2	Medicina Regenerativa.....	2
1.3	Células-tronco	4
1.4	Nanocristais (NC) de dióxido de titânio	8
1.	JUSTIFICATIVA.....	10
2.	OBJETIVOS	11
2.1	<i>Objetivo geral</i>	11
2.2	<i>Objetivos Específicos</i>	11
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1	<i>Isolamento das CTM-TA de cão pelo método não-enzimático</i>	12
4.2	<i>Determinação de densidade celular</i>	13
4.3	<i>Síntese e caracterização das NCs de TiO₂</i>	14
4.4	<i>Dispersão das NCs de TiO₂</i>	14
4.5	<i>Ensaio de viabilidade e proliferação com Alamar Blue</i>	15
4.6	<i>Ensaio de migração wound healing</i>	16
4.7	<i>Análises Estatísticas</i>	17
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1	<i>Isolamento das células-tronco de tecido adiposo de cão</i>	17
5.2	<i>Síntese e caracterização dos NCs de TiO₂</i>	19
5.3	<i>Viabilidade celular com Alamar Blue</i>	19
5.4	<i>Proliferação celular com Alamar Blue</i>	21
5.5	<i>Migração celular</i>	23
5.	CONCLUSÃO.....	26
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características das amostras dos NCs, quanto a temperatura de síntese, tamanho/diâmetro e composição..... **13**

Tabela 2 Percentual de fechamento da ferida utilizando NCs de TiO₂ RA e RB nas concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL no tempo de 24 horas..... **23**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Processo de obtenção de amostra do tecido adiposo canino para isolamento das CTM-TA. (A) Processo de coleta do fragmento de gordura abdominal, durante cirurgia de castração de cadelas. (B) Fragmentação da amostra no fluxo laminar utilizando bisturis estéreis. (C) Fragmentos de tecido adiposo posicionados na garrafa de cultivo celular. **16**
- Figura 2** Morfologia das CTM-TA em terceira (A e B) e quarta passagem (C e D): aderente e morfologia fibroblastóide. Fotografia obtida através de microscopia eletrônica nos aumentos de 4x (A) e 10x (B) em terceira passagem e aumentos de 4x (C) e 10x (D) em quarta passagem **18**
- Figura 3** Viabilidade celular utilizando Alamar Blue após 24 horas de tratamento com NCs nas fases RA e RB nas concentrações 50µg/mL e 100µg/mL **21**
- Figura 4** Efeito dos NCs de TiO₂ RA e RB nas concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL após 3 e 5 dias na proliferação das CTM-TA **20**
- Figura 5** Percentual de fechamento da ranhura utilizando NCs de TiO₂ RA e RB nas concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL no tempo de 24 horas..... **23**
- Figura 6** Migração celular dos tratamentos de NCs nos tempos 0 e 24 horas. Imagens do ensaio de wound healing mostrando a migração das células CTM-TA tratadas com NCs de TiO₂ RA e RB nas concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL nos tempos 0 e 24 horas no aumento de 10X (400µm) do microscópio Evos **24**

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fraturas ósseas em cães

Os cães têm sido companheiros humanos fiéis desde sua domesticação, há milhares de anos; e atualmente constituem a maioria da população de animais domésticos. Com várias melhorias na medicina veterinária nas últimas décadas, a expectativa de vida dos cães aumentou. No entanto, assim como nos humanos, um efeito colateral infeliz dessa longevidade é o aumento na ocorrência de doenças crônicas e degenerativas, que acabam prejudicando e enfraquecendo diversos órgãos do animal, como os ossos (IPCT, 2015).

Esses animais de estimação são propensos a fraturas ósseas apendiculares, que são frequentemente causadas por lesões traumáticas ou patologia óssea. Grande parte das fraturas ocorre por trauma indireto, onde uma força externa é transmitida a um osso de uma forma específica, causando a fratura (JAIN *et al.*, 2018).

Um estudo realizado por Jain et al (2018), foi analisado em quais ossos caninos ocorre o maior índice de fraturas. No estudo em questão, 14,754 cachorros foram atendidos em um complexo clínico veterinário durante 16 meses. Dentre os casos de fratura óssea, a ocorrência de fratura foi maior no fêmur (35,50%), seguido de fratura de tibia-fíbula (28,99%), rádio-ulna (18,34%), úmero (10,05%) e outros ossos como metacarpo, metatarso (4,73%) e as vértebras (2,36%) foram acometidas menos comumente, segundo as análises do estudo (JAIN *et al.*, 2018).

O estímulo da cicatrização óssea através da aplicação de enxerto ósseo é utilizado em um número significativo de cirurgias ortopédicas caninas anualmente. Nas cirurgias de reparo de fratura canina, o auto enxerto ósseo ainda é considerado o “padrão ouro”. O enxerto ósseo autógeno é definido como o tecido ósseo colhido de um sítio e transplantado em outro sítio no mesmo indivíduo. Um autoenxerto ósseo facilita uma boa formação óssea, o que pode levar à união óssea por meio de sua osteogênese, osteocondução e osteoindução. No entanto, existem várias desvantagens com esta abordagem, como por exemplo, um alto risco de fratura e infecção e dor no local doador (LEE *et al.*, 2009) (LAURENCIN; KHAN; EL-AMIN, 2006) (KAMRAN *et al.*, 2010).

Para solucionar essas desvantagens, diversos pesquisadores estão começando a aplicar técnicas relacionadas a medicina regenerativa para o tratamento de fraturas ósseas caninas. A medicina regenerativa utiliza uma combinação de diversos elementos, como células, *scaffolds*, nanopartículas, fatores de crescimento, entre outros para incentivar a formação e o potencial regenerativo dos tecidos.

1.2 Medicina Regenerativa

A regeneração de partes do corpo é um fenômeno que pode ser observado com frequência na natureza. Por exemplo, as salamandras possuem a capacidade de regenerar um membro amputado em alguns dias. Em contraste, a regeneração em mamíferos, é limitada ou ausente (ZHAO; QIN; FU, 2016).

Os humanos e mamíferos em idade adulta podem regenerar alguns órgãos, como o fígado. Se uma parte do fígado for danificado devido a um trauma ou doença, esse órgão pode voltar ao tamanho original, entretanto, ele não consegue voltar ao seu formato original. Além disso, o tecido da pele é constantemente cicatrizado e reparado. No entanto, a maioria dos tecidos humanos, não se regenera. O principal objetivo da medicina regenerativa é encontrar maneiras de desencadear a regeneração de tecidos no corpo ou de criar tecidos modificados (EUROSTEMCELL, 2016) (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012).

A medicina regenerativa é um campo interdisciplinar de pesquisa e aplicação clínica que envolve a substituição ou regeneração de tecidos ou órgãos que não estão funcionando de maneira ideal devido a diferentes causas, como trauma, envelhecimento, doença ou deficiências congênitas (MASON; DUNNILL, 2008).

Historicamente, o termo “medicina regenerativa” foi encontrado pela primeira vez em um artigo de 1992 de Leland Kaiser, que listou as tecnologias que impactariam o futuro dos hospitais. Porém, foi em 1999 que a medicina regenerativa foi dita pela primeira vez por William Haseltine durante uma conferência de 1999 no Lago de Como,

na tentativa de descrever esse campo emergente (SAMPOGNA; GURAYA; FORGIONE, 2015).

Nos últimos séculos, a medicina desenvolveu inúmeros avanços, como antibióticos, anestesia, técnicas de esterilização, entre outras. Entretanto, ainda existem muitas patologias que não podem ser tratadas pelos métodos convencionais, certas situações exigem uma evolução das possibilidades terapêuticas e a regeneração de partes do corpo. O rápido e recente sucesso observado nos resultados da medicina regenerativa está levando cada vez mais cientistas em todo o mundo a trabalhar em novas abordagens para lidar com falhas ou perdas de tecidos ou órgãos (SAMPOGNA; GURAYA; FORGIONE, 2015).

Algumas abordagens podem ser associadas à medicina regenerativa, como a terapia celular e engenharia de tecidos, e muitas ferramentas podem ser combinadas para aprimorar seus resultados, incluindo células-tronco, terapia gênica, nanomateriais, bem como tecnologias inovadoras, como bioimpressão 3D (POLYKANDRIOTIS; POPESCU; HORCH, 2010).

1.3 Células-tronco

As células-tronco (CT) são células não especializadas capazes de se replicar ou auto-renovar, bem como de se diferenciar em células especializadas. Elas possuem a capacidade de se diferenciar em outros tipos de células, agindo como um sistema de reparo para o corpo e reabastecendo outras células enquanto o organismo estiver vivo.

Devido a essas propriedades, as células-tronco são utilizadas como ferramentas de pesquisa para estudar diversos mecanismos de diferenciação celular, permitindo a compreensão da causa de diversas doenças, o que pode ajudar no desenvolvimento de novas terapias (SIVAKUMAR *et al.*, 2015).

As células-tronco podem ser identificadas e classificadas de acordo com suas capacidade de diferenciação, que refletem seu potencial de diferenciação ou “plasticidade”; ou de acordo com sua origem, que se refere ao seu estágio de desenvolvimento. Células de diferentes origens podem apresentar capacidade de diferenciação, potencial de autorrenovação e mecanismos de ação variados (SINGH *et al.*, 2016).

Em relação ao seu estágio de desenvolvimento, as células-tronco podem ser classificadas em: totipotente, pluripotente, multipotente, olipotente e unipotente. As totipotentes são células derivadas do ovo fertilizado (zigoto/blastômero) e têm o potencial de gerar todas as células embrionárias e extra-embrionárias; portanto, podem dar origem a todo o organismo. Por serem exclusivamente derivadas do zigoto, em humanos, extensas questões éticas estão atreladas a esse tipo de células (KELLY, 1977).

As células-tronco embrionárias têm uma capacidade ilimitada de autorrenovação, bem como o potencial de se diferenciar em todos os tipos de células do corpo. Elas são um grupo de células presentes na massa celular interna de um embrião em um estágio muito inicial de desenvolvimento, chamado de blastocisto, que é alcançado dentro de 4-5 dias após a fertilização. Elas formam o embrião e se diferenciam dentro do embrião em camadas

germinativas à medida que se especializam (ASAL; GÜVEN, 2020) (KLIMANSKAYA; KIMBREL; LANZA, 2020).

Já as pluripotentes, conseguem produzir todas as três células da camada de células germinativas e, assim, são capazes de dar origem a quase todos os tipos de células do corpo. Porém, elas não podem se desenvolver em um organismo completo (SINGH *et al.*, 2016).

As células-tronco multipotentes são conhecidas como uma das classes importantes de células-tronco, podem ser encontradas na maioria dos tecidos do corpo humano e se diferenciam em células de uma única camada germinativa (mesoderma, endoderma e ectoderma). Ou seja, podem se desenvolver em vários tipos de células especializadas presentes em um tecido ou órgão específico. A maioria das células-tronco adultas são células-tronco multipotentes, uma ampla gama de células células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras endoteliais, as células-tronco mesenquimais poderiam ser conhecidas como células-tronco multipotentes. Essas células podem ser diferenciadas em vários tecidos, como osso, cartilagem, gordura e músculo (MIRZAEI *et al.*, 2017).

Já as células-tronco adultas são células indiferenciadas encontradas no corpo adulto, que possuem propriedades de autorrenovação e diferenciação. Essas células são multipotentes e são capazes de dar origem aos tipos de células dos tecidos em que residem, e também são capazes de conservar a homeostase repondo células perdidas por injúrias. Esse tipo de célula pode ser encontrada nos ossos, tecido adiposo, sangue, músculos, pele e intestinos. As células tronco adultas são classificados como

hematopoiéticos, mesenquimais, epiteliais, musculares e neuronais (ASAL; GÜVEN, 2020).

Em meados da década de 1970, foi descoberta a aderência das células-tronco mesenquimais (CTMs) ao plástico e desde então diversos estudos constataram que essas células também poderiam se diferenciar em outros tipos celulares. As CTMs são uma fonte celular ideal para regeneração de tecidos, devido às excelentes propriedades apresentadas por elas como sua abundância em diversos tipos de tecido, como a medula óssea e o tecido adiposo, apresentando fácil isolamento, capacidade antiinflamatória e imunossupressora, não sendo detectadas pela vigilância imunológica e não levando à rejeição do enxerto após o transplante. Além disso, as CTMs podem se diferenciar em vários tipos celulares em estágio final para permitir sua semeadura em estruturas específicas (HAN *et al.*, 2019).

Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTM-TA) recentemente se tornaram uma substituição interessante para as células tronco de medula óssea, que eram as células-tronco mais bem estudadas pela comunidade científica. Isso aconteceu em razão da facilidade de coleta deste tecido, sendo menos doloroso e menos arriscado em comparação às CTM-TA de medula óssea. Pode ser obtida em grandes volumes, possui alto rendimento celular inicial e uma alta capacidade proliferativa *in vitro*. Foi constatado que existem 50 vezes mais células-tronco em 1 g de gordura quando comparado com 1 g de medula óssea aspirada (HASS *et al.*, 2011).

As células oligopotententes são geralmente conhecidas como células progenitoras, elas podem se dividir apenas em um número limitado de vezes e formar duas ou mais

cepas em um tecido específico. Por fim, as unipotentes podem se auto-renovar e se diferenciar em apenas um tipo de célula específico e formar uma única linhagem (ŁOS; SKUBIS; GHAVAMI, 2019).

Cientistas já geraram células pluripotentes reprogramando células somáticas, que ficaram conhecidas como células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) e compartilham características semelhantes às células-tronco embrionárias (ESCs). As iPSCs foram desenvolvidas em 2006 por Takahashi e Yamanaka, que mostraram que células-tronco com propriedades semelhantes às ESCs podem ser geradas a partir de fibroblastos de camundongos pela introdução simultânea de quatro genes: OCT4, SOX2, C-MYC e KLF4 (ASAL; GÜVEN, 2020). Além das iPSCs as células tronco podem ser também classificadas a partir de sua origem como: células-tronco embrionárias e células-tronco adultas.

Atualmente utiliza-se associar CTM-TA com nanobiomateriais na Medicina Regenerativa, dentre elas as nanopartículas.

1.4 Nanocristais (NC) de dióxido de titânio

Uma estratégia que vem se tornando cada vez mais popular na medicina regenerativa é o uso de materiais que podem guiar a regeneração endógena, usando os mecanismos regenerativos naturais presentes no corpo humano. Em aplicações para medicina regenerativa, nanomateriais como nanopartículas, que possuem propriedades químicas únicas e flexibilidade em seu *design*, podem fornecer diferentes moléculas

terapêuticas, incluindo drogas e fatores de crescimento que ajudam a otimizar o tratamento. (VAN RIJT; HABIBOVIC, 2017).

As nanopartículas são partículas coloidais sólidas com dimensões geralmente entre 10 e 100 nm, oferecem grande versatilidade em termos de tamanho, química de superfície e componentes e podem ser derivadas de vários tipos de materiais, como cerâmicas, metais, polímeros naturais e sintéticos. (FATHI-ACHACHELOUEI *et al.*, 2019).

O uso de nanopartículas em combinação com células-tronco mesenquimais tem sido objeto de estudo e pesquisa em diversas áreas da biotecnologia e podem ser utilizadas com diferentes propósitos, como marcadores para rastrear as células-tronco mesenquimais em tempo real, liberação de sinais químicos ou físicos que estimulem a atividade das células. Esses estímulos podem incluir fatores de crescimento, moléculas sinalizadoras ou até mesmo campos magnéticos ou elétricos (RAGHAV *et al.*, 2022) (SUN *et al.*, 2020).

As nanopartículas podem ser direcionadas para interagir com as células-tronco e aumentar sua capacidade de proliferação, diferenciação ou produção de fatores terapêuticos, o que conseqüentemente têm um grande potencial para regenerar tecidos danificados ou lesados (RAGHAV *et al.*, 2022) (SUN *et al.*, 2020).

Uma nanopartícula bastante investigada na medicina regenerativa são as nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂). As aplicações biomédicas do TiO₂ têm motivado grande interesse e intensos estudos experimentais e teóricos, devido às suas propriedades únicas como, excelente biocompatibilidade, alta estabilidade química e

baixa toxicidade. Materiais de dióxido de titânio também têm sido considerados uma opção interessante para a preparação de implantes para cirurgia em engenharia de tecidos ósseos, visto que elas são capazes de promover a adesão e proliferação de células relacionadas aos osteoblastos (YIN *et al.*, 2013).

Em um estudo de Duarte et al (2020), as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo foram isoladas e caracterizadas para avaliar a viabilidade celular e a internalização de nanocristais de TiO₂. Os resultados obtidos indicaram que a viabilidade das células foi significativamente melhorada com o associação ao TiO₂ com localização restrita no citoplasma, sugerindo que os nanocristais de dióxido de titânio não são genotóxicas e podem estar associadas à maioria das atividades celulares e vias metabólicas, incluindo glicólise e divisão celular (DUARTE *et al.*, 2020).

Assim, considerando as propriedades terapêuticas das nanopartículas, o uso das nanopartículas de TiO₂ associadas á células-tronco seria extremamente promissor para analisar o comportamento e a resposta destas células empregadas no tratamento de fraturas ósseas caninas através da medicina regenerativa.

1. JUSTIFICATIVA

As fraturas ósseas em cães são extremamente recorrentes, o que acarreta em um alto número de cirurgias ortopédicas caninas. Entretanto, existem várias desvantagens nas abordagens tradicionais de cirurgias ortopédicas caninas, como reincidência da fratura, infecção e dor extrema do local da fratura e de onde o enxerto é retirado, por isso, é de

extrema importância que seja estudado e desenvolvido abordagens alternativas para solucionar essa problemática. Assim, a medicina regenerativa, que é a combinação de diversos elementos como células, *scaffolds*, nanopartículas, fatores de crescimento, capazes de incentivar a formação e o potencial regenerativo dos tecidos, tem sido empregada por pesquisadores para aprimorar a recuperação de fraturas ósseas em cães.

Este projeto propõe utilizar técnicas que permeiam a medicina regenerativa para a análise da viabilidade, proliferação e migração das CTM-TA quando associadas a NCs de TiO₂. Tendo em vista que a associação dessas nanopartículas com as células pode ser vantajosa, aumentando o seu potencial viabilidade, proliferação e migração, o processo de regeneração do tecido ósseo também será otimizado, e pode ser empregado para inovar técnicas de reparo de fraturas ósseas caninas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar *in vitro* a viabilidade, proliferação e migração das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM-TA) de cão associadas a nanocristais de Dióxido de Titânio em diferentes concentrações.

2.2 Objetivos Específicos

- Análise de viabilidade e proliferação durante 5 dias de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo de cão associadas a NC de TiO₂ nas fases RA e RB e concentrações de 50 e 100mg/mL utilizando o ensaio de Alamar blue;

- Análise de migração de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo de cão associadas a NC de TiO₂ nas fases RA e RB e concentrações de 50 e 100mg/mL utilizando o ensaio *wound healing*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolamento das CTM-TA de cão pelo método não-enzimático

As células tronco mesenquimais foram obtidas a partir de tecido adiposo coletado de diferentes cães, fêmeas, durante cirurgias de castração no Hospital Universitário Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia.

Após o fim do procedimento, material coletado foi levado ao Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho da Universidade Federal de Uberlândia e em um tubo falcon de 50 mL contendo meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) completo e reservado na geladeira (Figura 1) Após esse processo, a amostra foi colocada em uma placa de petri e cortada em pedaços pequenos com bisturis, seguindo as condições de esterilidade.

Em uma garrafa de cultivo celular pequena de 25 cm², foram colocados 5 pedaços do tecido (um em cada ponta e um no meio) para que as células pudessem se aderir ao plástico. Em cada um dos fragmentos de tecido posicionado nas garrafas, foi adicionado SFB (soro fetal bovino), garantindo que eles ficassem completamente cobertos. Assim que o SFB foi adicionado, as garrafas com as amostras foram mantidas em uma incubadora umidificada a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período, as células foram observadas e adicionou-se meio DMEM contendo 10% de SFB com Antibiótico-Antimicótico 1X (GibcoTM, Life Technologies, CA, EUA).

O meio de cultura foi trocado 2-3 vezes por semana até que as células atingissem aproximadamente 80-90% de confluência. Foram utilizadas células na passagem 3-4 em todos os ensaios.

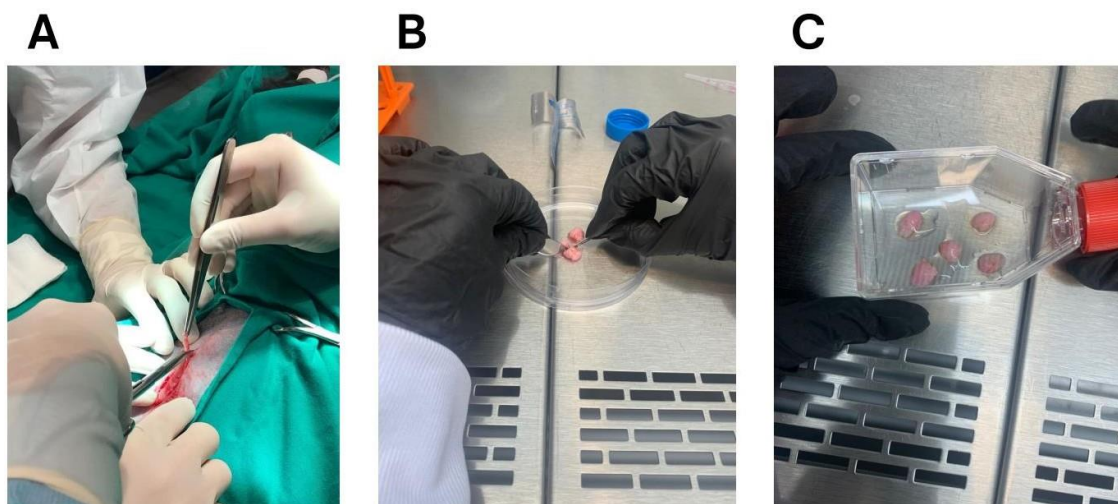


Figura 1: Processo de obtenção de amostra do tecido adiposo canino para isolamento das CTM-TA. (A) Processo de coleta do fragmento de gordura abdominal, durante cirurgia de cadastração de cadelas. (B) Fragmentação da amostra no fluxo laminar utilizando bisturis estéreis. (C) Fragmentos de tecido adiposo posicionados na garrafa de cultivo celular.

4.2 Determinação de densidade celular

Realizou-se a contagem das células antes da plaqueamento, utilizando o corante azul de tripan. Para isso, coletou-se uma amostra de células em suspensão e diluiu-se com azul de tripan a uma concentração de 0,4% em um tubo eppendorf, obtendo-se uma diluição de 1:1 e um fator de diluição (FD) de 2x. Após homogeneização, transferiu-se 10 μ l da amostra para a câmara de Neubauer, que foi então observada ao microscópio. A determinação da densidade celular, foi realizada pelo método de exclusão de azul de tripan, que é calculada pela seguinte equação:

$$\text{concentração celular/ml} = n^{\circ} \text{ de células viáveis } n^{\circ} \text{ de quadrantes } \times FD \times 10^4.$$

4.3 Síntese e caracterização das NCs de TiO₂

Os NCs de TiO₂ rutilo/anatase (RA) e rutilo/broquita (RB) foram sintetizados, caracterizados (tabela 1) e sedidos pelo Laboratório de Novos Materiais e Semicondutores (LNMIS), Instituto de Física, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

Amostra	Temperatura	Tamanho	Composição
Rutilo/Anatase (RA)	650°C	32 nm	35,44% anatase e 64,56% rutilo
Rutilo/Broquita (RB)	800°C	44,1 nm	84,07% rutilo e 15,93% broquita

Tabela 1: Características das amostras das NCs, quanto a temperatura de síntese, tamanho/diâmetro e composição

4.4 Dispersão das NCs de TiO₂

A dispersão das NCs foi preparada utilizando uma solução estoque de NCs das fases Rutilo/Anatase e Rutilo/Broquita em água ultrapura a uma concentração de 2 mg/mL (pH 4). Após este procedimento, um desintegrador ultrassônico (Q-Sônica 700 W, EUA) equipado com uma ponta de 19 mm de Ti foi usado para dispersar as 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 das NCs das amostras RA e RB em meio de cultura de células foi realizado por diluição da solução estoque de 2 mg/mL em DMEM (Gibco™, Life Technologies, Carls bad, CA, Estados Unidos)

suplementado com SFB (soro fetal bovino) a 10% (v/v), pH 7 para concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL. Devido ao aumento da agregação das NCs em meio de cultura, a proteína soro albumina bovina (BSA) foi utilizada como agente estabilizador. Para isso, adicionou-se 100µg/ml de BSA ao meio DMEM com SFB a 10% (RIBEIRO et al, 2016).

4.5 Ensaio de viabilidade e proliferação com Alamar Blue

Para analisar a viabilidade e proliferação das células, inicialmente, a solução para o ensaio foi preparada adicionando 1,5 mg da resazurina em 10mL de PBS 1 X (0,6mM). Esta solução foi filtrada e esterilizada através de um filtro de 0,22µm e seringa para um recipiente estéril e armazenada protegida da luz em temperatura de 4 °C. Com a solução pronta, foi plaqueado 2×10^4 de células em cada poço de uma placa de 96 poços e a mesma foi incubada com meio DMEM *overnight*. Foi plaqueado o controle negativo, o branco, e os tratamentos, RA 50 e 100 µl e RB 50 e 100 µl. No dia seguinte, o meio foi retirado e foi adicionado as nanopartículas por 24 horas. Após o período das 24 horas, as nanopartículas foram removidas e foi adicionado 20µl da solução de resazurina e 100µl de DMEM baixa glicose (0,1mM). Para o branco foi adicionado a mesma quantidade da resazurina. A placa foi novamente incubada na estufa por 1 - 4 horas no escuro. Posteriormente, o sobrenadante foi recolhido e transferido para a placa de leitura em fluorímetro. A placa foi lida no espectro de luz de excitação a 560 nm e de emissão a 590 nm. Absorbância 570nm e 600nm.

Para analisar os resultados de viabilidade a placa foi lida após 24 horas, e para os resultados de proliferação a placa foi lida nos tempos de 3 e 5 dias.

Após a leitura dos resultados na placa, os valores foram empregados na fórmula abaixo, usando 155,677 como valor de redução de resazurina em 570nm (ERED), 14,652

como valor de redução de resazurina em 570nm (ERED), 80,586 como valor de oxidação da resazurina em 570nm (EOX) e 117,216 valor de oxidação da resazurina em 600nm (EOX). Os valores e a fórmula foram extraídos do protocolo da Tip Biosystems para ensaio de viabilidade celular com Alamar Blue.

$$= \frac{\epsilon_{OX_600nm} \times A_{570nm_tx} - \epsilon_{OX_570nm} \times A_{600nm_tx}}{\epsilon_{RED_570nm} \times A_{600nm_to} - \epsilon_{RED_600nm} \times A_{570nm_to}}$$

4.6 Ensaio de migração wound healing

Para o ensaio de migração celular, As CTM-TA caninas foram tripsinizada e semeadas em placas de 24 poços com a concentração de $4 \cdot 10^4$ células por poço. com meio de cultura DMEM alta glicose contendo 10% SFB . As células foram mantidas na estufa de CO₂ a 37°C até atingirem a confluência de 90% Após atingirem a confluência, o meio foi removido e adicionado o tratamento com as NCs de TiO₂, nas fases RA e RB em 2 diferentes concentrações: 50µg/mL e 100µg/mL. Nos poços de controle foi adicionado somente meio DMEM alta glicose e 10% SFB. Após esse processo, foi feito um risco em cada poço, criando uma fenda sem células, utilizando uma ponta de micropipeta 200 µl estéril sob um ângulo de cerca de 90 graus, para que as células pudessem ser separadas em dois lados (direita e esquerda). Foi utilizado o microscópio EVOS para obter as imagens de 0 e 24h no aumento de 10x e as imagens foram analisadas com o programa ImageJ (Tscratchshortcut). A análise estatística ANOVA - Tukey foi feita utilizando o software Prism 7.0.

4.7 Análises Estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento das células-tronco de tecido adiposo de cão

Durante a otimização do isolamento e cultura das células utilizou-se o meio de cultura indicado para cultivo de CTM-TA caninas: DMEM alta glicose e DMEM baixa glicose. Trabalhos como o de Vieira et al (2010), utilizaram meio DMEM alta glicose (DMEM-HG 10% FBS). Em contraponto, outros estudos como Ivanoska et al (2017), fizeram uso do meio DMEM baixa glicose ((DMEM baixa glicose, Gibco adicionado com 10% de soro fetal bovino (FBS), Gibco; penicilina 0,10U/ml, Gibco; estreptomicina 0,10 µg, Gibco; anfotericina B 2,5 µg/ml, Gibco) (IVANOVSKA et al., 2017) (VIEIRA et al., 2010).

Inicialmente as células foram cultivadas com o meio DMEM baixa glicose, no entanto após analisarmos um baixo desempenho das células, passamos a cultivá-las como o meio de cultura DMEM alta glicose. Essa troca acarretou em um maior desempenho e velocidade de crescimento das células.

Para os ensaios, foram utilizadas células na passagem 3-4. Na passagem 5, a viabilidade celular apresentou uma queda considerável, prejudicando seu potencial de performance nos ensaios. Por isso, após a quinta passagem as células foram descartadas.

À medida que as células-tronco mesenquimais são submetidas a passagens repetidas, podem ocorrer alterações em suas características biológicas e funcionais, o que

pode afetar sua viabilidade celular. Diversos fatores podem contribuir para a redução da viabilidade celular durante o aumento do número de passagens das células-tronco mesenquimais, como a senescência celular, acúmulo de danos no DNA, além do estresse oxidativo, causado pela produção excessiva de radicais livres, que as células estão sujeitas durante o cultivo celular (BYDLOWSI et al. 2009).

Além disso, o elevado número de passagens pode gerar alterações nas propriedades de adesão celular. Essas propriedades de adesão são essenciais para a sobrevivência de função das células-tronco mesenquimais. Ademais, a adesão juntamente com a morfologia fibroblastóide, são parâmetros de caracterização de uma célula-tronco. Esses parâmetros podem ser observados na figura abaixo, que mostra a aderência ao plástico e morfologia fibroblastóide das CTM-TA em terceira e quarta passagem. (Figura 2).

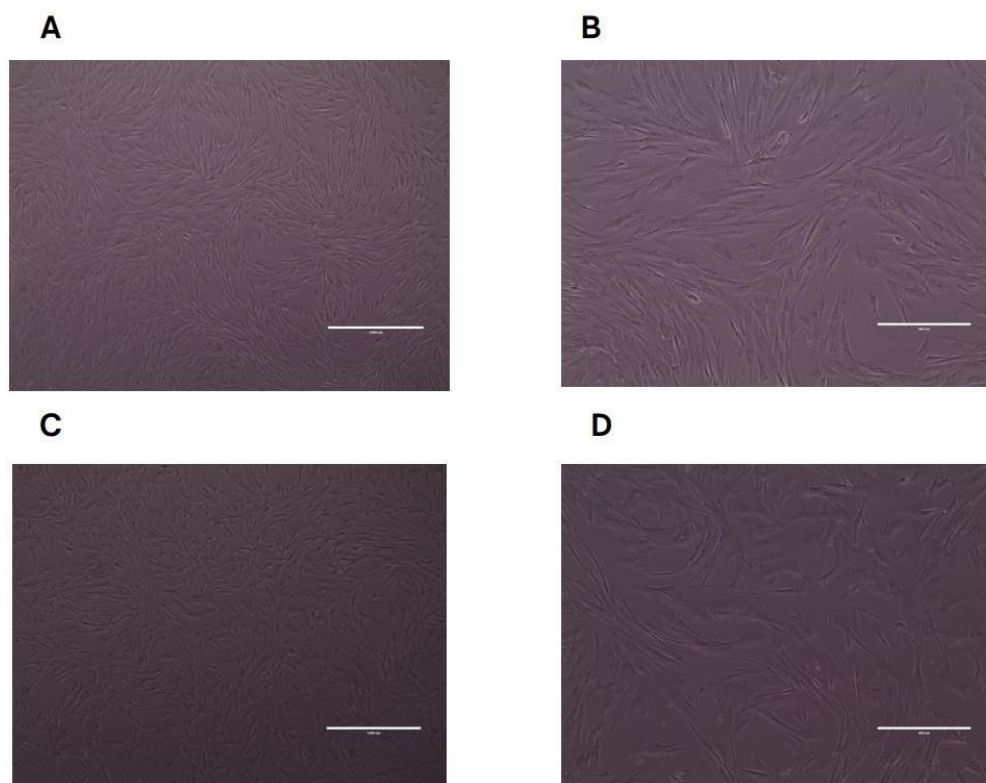


Figura 2: Morfologia das CTM-TA em terceira (A e B) e quarta passagem (C e D): aderente e morfologia

fibroblastóide. Fotografia obtida através de microscopia eletrônica nos aumentos de 4x (A) e 10x (B) em terceira passagem e aumentos de 4x (C) e 10x (D) em quarta passagem.

5.2 Síntese e caracterização dos NCs de TiO₂

A síntese e caracterização dos NCs de TiO₂ foram realizadas pelo Laboratório de Novos Materiais e Semicondutores (LNMIS), Instituto de Física, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil. Baseados nos resultados de XRD e micro-Raman performados pelo LNMIS, foi possível concluir que os NCs de TiO₂ são de alta pureza e exibem diferentes fases em função do tratamento térmico.

5.3 Viabilidade celular com Alamar Blue

Os ensaios de viabilidade e proliferação celular foram realizados utilizando a técnica Alamar Blue, que consiste no uso da resazurina, um indicador redox permeável às células. Quando dissolvida em tampões fisiológicos, a resazurina resulta em uma solução de cor azul escuro e é adicionada diretamente às células em cultura. Quando as células estão viáveis e com metabolismo ativo elas podem reduzir a resazurina no produto resorufina, que apresenta cor rosa e fluorescente (RISS et al., 2016).

A viabilidade celular está diretamente atrelada com a funcionalidade das CTM-TA. Uma boa viabilidade celular é essencial para garantir que as células estejam em boas condições durante a cultura *in vitro* para realização dos demais experimentos, e também é fundamental para garantir seu êxito em futuras aplicações em terapias celulares (LIANG et al 2019).

De acordo com a A ISO 10993-5:2009, que descreve métodos de teste para avaliar a citotoxicidade *in vitro*, amostras que resultem em uma viabilidade inferior à 70% em relação ao controle são consideradas citotóxicas. A figura 4 mostra que o uso de RA e RB de TiO₂ nas concentrações de 50 e 100µg/mL nas células durante 24 horas não apresentou citotoxicidade, visto que o percentual de viabilidade celular em todos os tratamento foi acima de 80%. Os resultados não apresentaram significância estatísticas (Ordinary one-way ANOVA).

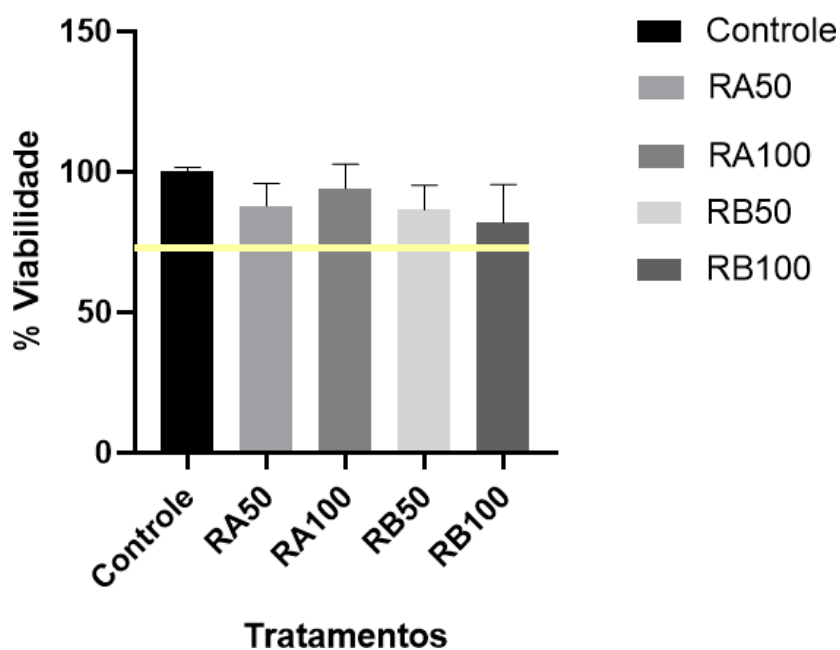


Figura 3: Viabilidade celular utilizando alamar blue após 24 horas de tratamento com NCs nas fases RA e RB nas concentrações 50µg/mL e 100µg/mL. As análises estatísticas foram avaliadas pelo método ANOVA-One-Way.

No trabalho de Vega *et al*, CTM-TA humanas foram cultivadas por 2, 5 e 7 dias com 500 µg/mL de TiO₂ exibiram uma viabilidade de 60%, 70% e 70% na viabilidade, respectivamente. No entanto, abaixando a concentração para 62,5 µg/mL foi exibido uma

recuperação de mais 20% da viabilidade. Esses resultados são compatíveis aos apresentados na figura acima, onde em ambas as concentrações de 50 e 100 µg/mL atingiu um percentual maior de 80% (VEGA *et al* 2020).

5.4 Proliferação celular com Alamar Blue

A proliferação celular adequada, além de ser essencial para obter uma quantidade suficiente de CTM-TA para aplicações terapêuticas e pesquisas científicas, garante que haja um número suficiente de células disponíveis para se diferenciarem em células especializadas quando necessário, contribuindo para a regeneração e reparação de tecidos danificados. E, também, ajuda a preservar a função e a plasticidade das CTM-TA, garantindo sua capacidade de responder a estímulos ambientais e desempenhar suas funções biológicas (BHASIR *et al* 2018).

A Figura 3 exibe os resultados do teste de proliferação celular nos dias 3 e 5 após 24 h de tratamento com os NCs RA e RB. No dia 3, a proliferação celular aumentou, porém sem significância estatística, com os tratamentos RA 100µg/mL, RB 50µg/mL e RB 100µg/mL em relação ao controle. No dia 5, a proliferação celular se manteve próxima ao do controle, porém com um pequeno aumento nos tratamentos RA 100µg/mL, RB 50µg/mL e RB 100µg/mL, e uma pequena redução no tratamento RA50 µg/mL. Os resultados não apresentaram significância estatísticas.

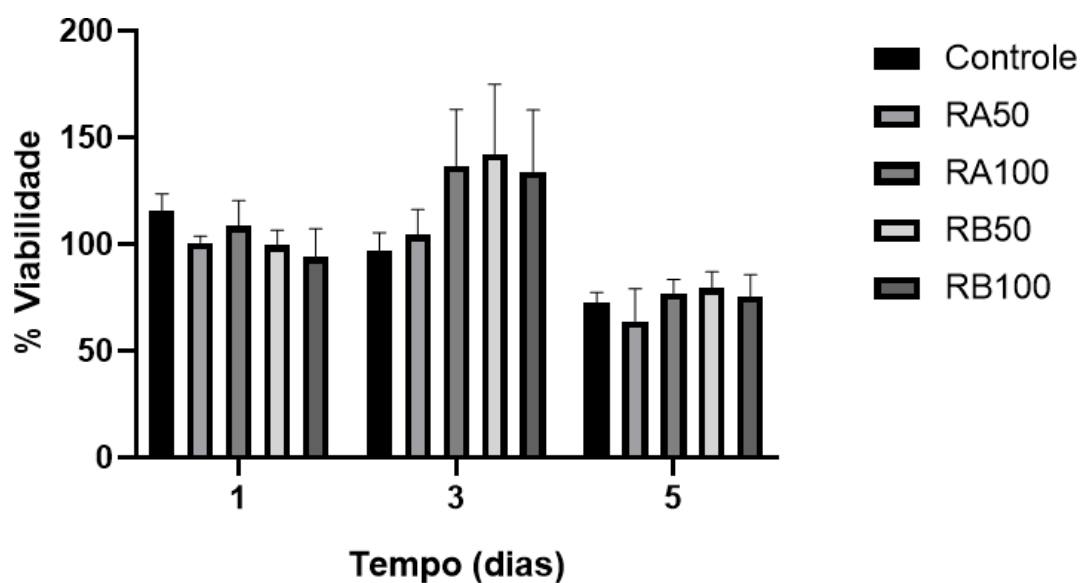


Figura 4: Efeito das NCs de TiO₂ RA e RB nas concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL após 3 e 5 dias na proliferação das CTM-TA. As análises estatísticas foram avaliadas pelo método ANOVA-One-Way.

Os resultados de proliferação celular, no estudo de Vega *et al*, também foram similares aos deste estudo (Figura 3). Em Vega *et al*, a diminuição na proliferação celular de expostas NCs de TiO₂ foi dependente da concentração. Na concentração de 500 µg/mL a proliferação celular exibiu valores de 65, 45 e 50% nos dias 2, 5 e 7, respectivamente, mostrando-se significativamente diferente do controle (não tratado com NCs de TiO₂). No entanto com a redução da concentração para 62,5 µg/mL a proliferação atingiu cerca de 85% nos três tempos, valor próximos aos encontrados nos tempos 3 e 5 deste trabalho (Figura 3) (VEGA *et al* 2020).

5.5 Migração celular

A migração celular é essencial para o desenvolvimento e regeneração de tecidos, pois permite que as CTM-TA se desloquem para áreas danificadas ou necessitadas de reparo (SU *et al* 2018).

No teste de migração celular foi observado o comportamento das CTM-TAs com os tratamentos dos NCs de TiO₂ após 24 horas. Foi possível verificar que todos os tratamentos apresentaram um potencial de migração celular, avaliado pelo percentual de cicatrização da ranhura feita nas células, maior que o controle (CTM-TA apenas como meio de cultura). Com exceção do RB50 que apresentou percentual muito próximo do controle (Tabela 2). Com os tratamentos RA 50µg/mL, RA 100µg/mL, e RB 100µg/mL os percentuais de cicatrização ficaram acima de 43%. Os resultados não apresentaram significância estatísticas (Ordinary one-way ANOVA) (Figura 5 e 6).

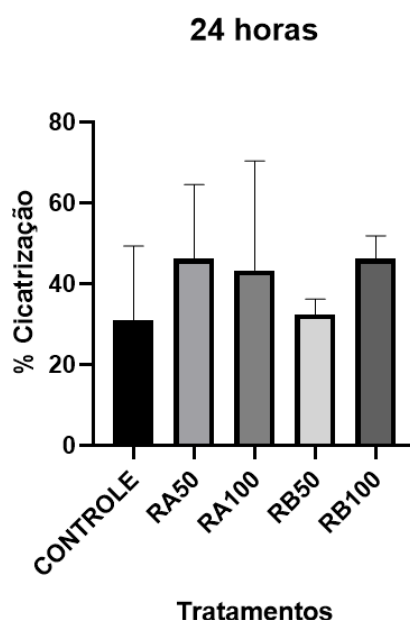


Figura 5: Percentual de fechamento da ranhura utilizando NCs de TiO₂ RA e RB nas concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL no tempo de 24 horas.

TRATAMENTOS	Controle	RA50	RA100	RB50	RB100
% MÉDIA DE CICATRIZAÇÃO	31,05	46,25	43,39	32,35	46,20

Tabela 2: Percentual de fechamento da ranhura utilizando NCs de TiO₂ RA e RB nas concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL no tempo de 24 horas.

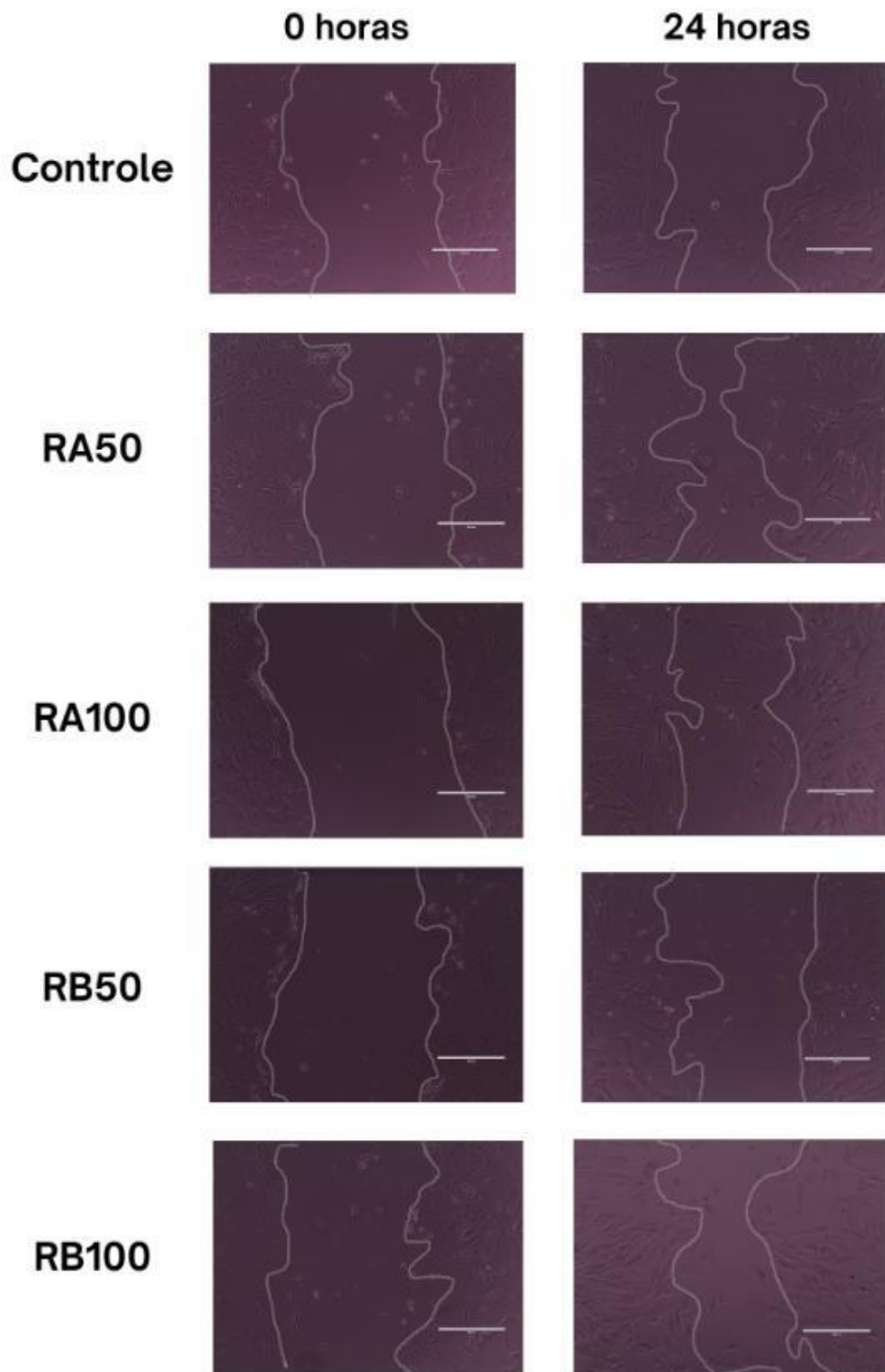


Figura 6: Migração celular dos tratamentos de NCs nos tempos 0 e 24 horas. Imagens do ensaio de *wound healing* mostrando a migração das células CTM-TA de cão tratadas com NCs de TiO₂ RA e RB nas concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL nos tempos 0 e 24 horas no aumento de 10X (400µm) do microscópio Evos.

Resultados similares podem ser analisados em Cai *et al.*, onde também foi realizado testes de wound healing para migração celular usando NCs de TiO₂, porém com células tronco humanas e não caninas. Após cultura por 12 horas, células tratadas com NCs de TiO₂ migraram para o centro do campo da ferida, e quando a concentração dos NCs foi reduzida menos células migraram para o centro da ranhura. Assim como no presente estudo, os NCs auxiliaram a migração celular em relação ao controle (Cai *et al.*, 2013).

As CTM-TA de cão associadas aos NCs de TiO₂ não foram citotóxicos, sendo que os NCs RA 100µg/mL, RB 50µg/mL e RB 100µg/mL conseguiram aumentar significativamente (sem significância estatística) a proliferação das células em 3 dias. Além disso, os NCs também demonstraram uma tendência a aumentar a migração celular.

5. CONCLUSÃO

Em suma, pode-se inferir que a associação das CTM-TA caninas com os NCs de TiO₂ nas fases RA e RB em concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL apresentou uma tendência em aumentar a migração celular em comparação ao grupo controle, além de não apresentaram efeito citotóxico na viabilidade e proliferação celular. Para garantir uma futura possível regeneração óssea associada as células-tronco mesenquimais associadas aos NCs de TiO₂ é necessário a realização de outros ensaios como indução de diferenciação osteogênica e ensaios *in vivo*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASAL, Melis; GÜVEN, Sinan. 7 - Stem cells: sources, properties, and cell types. *In*: VRANA, Nihal Engin; KNOPF-MARQUES, Helena; BARTHES, Julien (eds.).

Biomaterials for Organ and Tissue Regeneration. [S. l.]: Woodhead Publishing, 2020. p. 177–196.

BASHIR, S., SHARMA, A., SIDDIQUI, N. A., & TIWARI, R. K. Proliferation of human mesenchymal stem cells is governed by geometrical and mechanical properties of substrate. **Stem Cell Research & Therapy**, 9(1), 213. 2018.

BOSE, Sumita.; ROY, Mangal.; BANDYOPADHYAY, Amit. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 546–554, out. 2012.

BYDŁOWSKI, Sérgio; DEBES, Adriana. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 25–35, 1 maio 2009.

CAI, Kaiyoung; HOU Yanhua; LI, Jinghua; CHEN, Xiuyoung. Effects of titanium nanoparticles on adhesion, migration, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells. **International Journal of Nanomedicine**, p. 3619, set. 2013.

CAMARGO, Pedro Henrique Cury; SATYANARAYANA, Kestur Gundappa; WYPYCH, Fernando. Nanocomposites: synthesis, structure, properties and new application opportunities. **Materials Research**, vol. 12, no. 1, p. 1–39, 2009.

DUARTE, C. A.; GOULART, L. R.; FILICE, L. de S. C.; LIMA, I. L. de; CAMPOS-FERNÁNDEZ, E.; DANTAS, N. O.; SILVA, A. C. A.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. D.; CARDOSO, C. M. A.; FRANÇA, L. S. de A.; ROCHA, V. P. C.; RIBEIRO,

A. R. L. P.; PEREZ, G.; CARVALHO, L. N.; ALONSO-GOULART, V.

Characterization of Crystalline Phase of TiO₂ Nanocrystals, Cytotoxicity and Cell Internalization Analysis on Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells.

Materials, vol. 13, no. 18, 14 Sep. 2020. DOI 10.3390/ma13184071. Available at: <http://dx.doi.org/10.3390/ma13184071>.

FATHI-ACHACHELOUEI, Milad; KNOPF-MARQUES, Helena; RIBEIRO DA SILVA, Cristiane Evelise; BARTHÈS, Julien; BAT, Erhan; TEZCANER, Aysen; VRANA, Nihal Engin. Use of Nanoparticles in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, vol. 7, p. 113, 24 May 2019. .

HAN, Yu; LI, Xuezhou; ZHANG, Yanbo; HAN, Yuping; CHANG, Fei; DING, Jianxun. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. **Cells** , vol. 8, no. 8, 13 Aug. 2019. DOI 10.3390/cells8080886. Available at: <http://dx.doi.org/10.3390/cells8080886>.

HASS, Ralf; KASPER, Cornelia; BÖHM, Stefanie; JACOBS, Roland. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. **Cell communication and signaling: CCS**, vol. 9, p. 12, 14 May 2011. .

IPCT. IPCT – Instituto de Pesquisa com Células-tronco. . Available at: <http://celulastroncors.org.br/nova-terapia-com-celulas-tronco-em-caes-um-avanco-na-medicina-veterinaria/>. Accessed on: 10 Mar. 2022.

IVANOVSKA, Ana; GROLLI, Stefano; BORGHETTI, Paulo. Immunophenotypical characterization of canine mesenchymal stem cells from perivisceral and subcutaneous

adipose tissue by a species-specific panel of antibodies. **Research in Veterinary Science**, v. 114, p. 51–58, out. 2017.

JAIN, R.; SHUKLA, B. P.; NEMA, S.; SHUKLA, Supriya; CHABRA, Daljeet; KARMORE, S. K. Incidence of fracture in dog: a retrospective study. **Veterinary Practitioner**, vol. 19, no. 1, p. 63–65, 2018. .

KAMRAN, Kaveh; RASHID, Ibrahim; MOHD, Zuki; TENGKU, Azmi Ibrahim; OTHERS. Bone grafting and bone graft substitutes. **Journal of animal and veterinary advances: JAVA**, vol. 9, no. 6, p. 1055–1067, 2010. .

KELLY, Susan J. Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. **Journal of Experimental Zoology**, vol. 200, no. 3, p. 365–376, 1977. DOI 10.1002/jez.1402000307. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/jez.1402000307>.

KLIMANSKAYA, Irina; KIMBREL, Erin A.; LANZA, Robert. Embryonic stem cells. **Principles of Tissue Engineering**, , p. 421–434, 2020. DOI 10.1016/b978-0-12-818422-6.00024-1. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-818422-6.00024-1>.

LAURENCIN, Cato; KHAN, Yusuf; EL-AMIN, Saadiq F. Bone graft substitutes. **Expert review of medical devices**, vol. 3, no. 1, p. 49–57, Jan. 2006. .

LEE, H. B.; CHUNG, Y. S.; HEO, S. Y.; KIM, N. S. Augmentation of bone healing of nonunion fracture using stem cell based tissue engineering in a dog: a case report. **Veterinarni medicina**, vol. 54, no. 4, p. 198–203, 2009. .

LIANG, L., LI, Z., MA, T., HAN, Y., & ZHU, Y. Viability and functionality of mesenchymal stem cells. *Stem Cells International*, 2019.

ŁOS, Marek J.; SKUBIS, Aleksandra; GHAVAMI, Saeid. Stem Cells. **Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine**, , p. 5–16, 2019. DOI 10.1016/b978-0-12-812258-7.00002-2. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-812258-7.00002-2>.

MASON, Chris; DUNNILL, Peter. A brief definition of regenerative medicine. **Regenerative medicine**, vol. 3, no. 1, p. 1–5, Jan. 2008. .

MIRZAEI, Hamed; SAHEBKAR, Amirhossein; SICHANI, Laleh Shiri; MORIDIKIA, Abdullah; NAZARI, Sara; SADRI NAHAND, Javid; SALEHI, Hossein; STENVANG, Jan; MASOUDIFAR, Aria; MIRZAEI, Hamid R.; JAAFARI, Mahmoud R. Therapeutic application of multipotent stem cells. **Journal of cellular physiology**, vol. 233, no. 4, p. 2815–2823, 5 May 2017. .

POLYKANDRIOTIS, E.; POPESCU, L. M.; HORCH, R. E. Regenerative medicine: then and now--an update of recent history into future possibilities. **Journal of cellular and molecular medicine**, vol. 14, no. 10, p. 2350–2358, Oct. 2010. .

REGENERATION: WHAT DOES IT MEAN AND HOW DOES IT WORK? 19 Aug. 2016. Available at: <https://www.eurostemcell.org/regeneration-what-does-it-mean-and-how-does-it-work>. Accessed on: 10 Mar. 2022.

RAGHAV, Pawan; MANN, Zoya; AHLAWAT, Swati; and MOHANTY, SUJTA. Mesenchymal stem cell-based nanoparticles and scaffolds in regenerative medicine. **European Journal of Pharmacology**, v. 918, p. 174657, mar. 2022.

RISS, T. L. et al. **Cell Viability Assays**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>.

SAMPOGNA, Gianluca; GURAYA, Salman Yousuf; FORGIONE, Antonello.
Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine.
Journal of microscopy and ultrastructure, vol. 3, no. 3, p. 101–107, Jul. 2015. .

SINGH, Vimal K.; SAINI, Abhishek; KALSAN, Manisha; KUMAR, Neeraj;
CHANDRA, Ramesh. Describing the Stem Cell Potency: The Various Methods of
Functional Assessment and In silico Diagnostics. **Frontiers in Cell and
Developmental Biology**, vol. 4, 2016. DOI 10.3389/fcell.2016.00134. Available at:
<http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2016.00134>.

SIVAKUMAR, Muniapillai; DINESHSHANKAR, Janardhanam; SUNIL, P. M.;
NIRMAL, R. Madhavan; SATHIJAJEEVA, J.; SARAVANAN, Balasubramanian;
SENTHILEAGAPPAN, A. R. Stem cells: An insight into the therapeutic aspects from
medical and dental perspectives. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, vol. 7, no.
Suppl 2, p. S361–71, Aug. 2015. .

SUN, Yuting; LU, Yuexin; LI, Yin. The Roles of Nanoparticles in Stem Cell-Based
Therapy for Cardiovascular Disease. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**,
v. 8, 14 ago. 2020.

SU, Peihong; YE, Tian; CHAOFEI, Yang; XIAOLI, Ma; XUE, Wang; JIAWEI, Pei;
AIRONG, Qian. Mesenchymal Stem Cell Migration during Bone Formation and Bone
Diseases Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, 9 ago.
2018.

VAN RIJT, Sabine; HABIBOVIC, Pamela. Enhancing regenerative approaches with
nanoparticles. **Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society**, vol. 14,

no. 129, Apr. 2017. DOI 10.1098/rsif.2017.0093. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2017.0093>.

VIEIRA, N. M. et al. Isolation, Characterization, and Differentiation Potential of Canine Adipose-Derived Stem Cells. **Cell Transplantation**, v. 19, n. 3, p. 279–289, mar. 2010.

PERALTA, Vega; BERENICE, Adriana. Toxic effect of titanium dioxide nanoparticles on human mesenchymal stem cells. v. 16, n. 3, p. 321–330, 10 jun. 2020.

YIN, Zi Fei; WU, Long; YANG, Hua Gui; SU, Yong Hua. Recent progress in biomedical applications of titanium dioxide. **Physical chemistry chemical physics: PCCP**, vol. 15, no. 14, p. 4844–4858, 14 Apr. 2013. .

ZHAO, Andong; QIN, Hua; FU, Xiaobing. What Determines the Regenerative Capacity in Animals? **Bioscience**, vol. 66, no. 9, p. 735–746, 20 Jul. 2016. . Accessed on: 10 Mar. 2022.