U UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Interferência das Diferentes Fases dos Nanocristais de Dióxido de Titânio na Migração de Células-Tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo Humano.

Loyna Nobile Carvalho

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

Uberlândia – MG

Dezembro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Interferência das Diferentes Fases dos Nanocristais de Dióxido de Titânio na Migração de Células-Tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo Humano.

Loyna Nobile Carvalho

Prof.ª Dr.ª Vivian Alonso Goulart

(Instituto de Biotecnologia)

Isabela de Lemos Lima

(Instituto de Biotecnologia)

Homologado pela coordenação do Curso de Biotecnologia em / / .

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos.

Uberlândia – MG

Dezembro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Interferência das Diferentes Fases dos Nanocristais de Dióxido de Titânio na Migração de Células-Tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo Humano.

Loyna Nobile Carvalho

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota:

_____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, 13 de dezembro de 2019.

Agradecimentos

Primeiramente quero agradecer aos meus pais Aldria e Neimar que sem o apoio e a dedicação de vocês durante todos esses anos nada teria sido possível. Ao meu irmão João Victor que sempre foi meu exemplo e me deu tanta força para nunca desistir, sem vocês três, eu não teria chegado tão longe.

Agradeço também todos meus companheiros do laboratório de nanobiotecnologia UFU que de alguma forma contribuíram para meu conhecimento, e especialmente minhas companheiras de laboratório Isabela, Mirella e Cristiane que sempre me ajudaram em tudo, e ao meu grupo de pesquisa GEP-CT.

Agradeço especialmente as minhas professoras orientadoras Dra. Vivian Alonso Goulart e Dra. Letícia de Souza Castro Filice, por tudo que aprendi com vocês, e por me deixarem fazer parte de um grupo de pesquisa que é muito especial para mim.

RESUMO

Células-tronco mesenquimais (CTMs) são definidas como células adultas indiferenciadas que possuem a característica de autorrenovação, podendo ser isoladas de vários tecidos humanos. A nanobiotecnologia pode auxiliar na eficácia da regeneração tecidual, por isso a associação de CTM com nanocristais está sendo proposto neste trabalho com o uso do dióxido de titânio (TiO2), que possui três estruturas cristalinas: anatase, rutilo e broquita. O objetivo desse trabalho foi analisar in vitro a capacidade de migração das células tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM-TA) associadas a NCs de TiO2 em diferentes fases nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL e 200 µg/mL após sua preparação com agente estabilizador. Realizou-se primeiramente o isolamento e a caracterização das CTMs, em seguida foi sintetizado os NCs de TiO2 e realizado o teste de dispersão e por fim foi realizado o ensaio de migração celular. A migração aumentou na concentração de 50 µg/mL na fase rutilo/broquita fechando a ferida (*in vitro*) em 80%, enquanto na fase anatase não houve alteração na migração celular. Portanto, a migração de CTM-TA in vitro aumenta quando tratada com NCs de TiO2 na fase rutilo/broquita, dispersos com agente estabilizador na concentração de 50µg/mL.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais, nanocristais, dióxido de titânio, migração celular.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. Medicina Regenerativa.....1

1.2. Células-tronco mesenquimais.....3

1.3. Nanomateriais associados as CTMs.....4

1.4. Migração Celular 5

2. OBJETIVO.....6

3. METODOLOGIA.....6

3.1. Isolamento das CTM-TAs humano pelo método não-enzimático.....6

3.2. Caracterização das CTM-TAs.....7

3.2.1. Análise de marcadores específicos de membrana.....7

3**.2.2. Diferenciação celular** 8

3.3. Síntese e caracterização dos NCs de TiO2.....9

3.4. Dispersão dos NCs de TiO2.....10

3.5. Ensaio de DLS (Dynamic Light Scattering).....11

3.6. Migração Celular.....12

4. RESULTADOS E DICUSSÃO.....12

4.1. Isolamento e caracterização das CTM-TAs.....12

4.2. Síntese e caracterização dos Nanocristais de dióxido de titânio.....17

4.3. Análise do DLS.....20

4.4. Migração Celular.....23

5. CONCLUSÃO.....26

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Marcadores positivos (CD13, CD73, CD29, CD90 e CD44) de CTM-TA, fluoróforos utilizados e seus respectivos isotipos.....8

Tabela 2 Características de cada amostra dos NCs, quanto a temperatura de síntese, tamanho/diâmetro e composição.....10

Tabela 3 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.....20

Tabela 4 Valores do Pdl nas 4 amostras de NCs em água ultrapura e meio completo (DMEM+SFB+BSA).....22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Número de pesquisas em diferentes fases de ensaios clínico realizadas no mundo e na América do Sul utilizando células-tronco. As cores representam a quantidade de ensaios clínicos no local sendo o verde as menores quantidades e o vermelho as maiores quantidades de pesquisas no local.....2

Figura 2 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.....13

Figura 3 Análise da viabilidade das células analisadas pela Citometria de Fluxo.....13

Figura 4 Análise dos marcadores positivos CD13, 29 e 44 da população de CTM-TA por citometria de fluxo.....14

Figura 5 Análise dos marcadores positivos CD79 e 90 da população de CTM-TA por citometria de fluxo.....15

Figura 6 Diferenciação adipogênica após 21 dias mostrando o controle (A) e as CTM-TAs diferenciadas (B), após coloração com o vermelho nilo marcando as células e hoechst marcando o núcleo, no aumento de 20x.....16

Figura 7 Diferenciação osteogênica com 21 dias mostrando o controle (A) e as CTM-TAs diferenciadas (B), após coloração com a alizarina red no aumento de 10x.....17

Figura 8 Padrões XRD das amostras sujeitas a técnicas de recozimento a 100ºC / 24h, 500ºC/ 1h, 650º C / 1h e 800ºC / 1h.....18

Figura 9 Espectro Micro Raman de NCO de TiO2 sujeitos a 100ºC / 24h, 500ºC / 1h, 650ºC / 1h e 800ºC / 1h.....19

Figura 10 Tamanho dos aglomerados de NCs de TiO2 das 4 amostras quando sonicadas em água ultrapura e em meio completo. (ANOVA-Turkey: ***p > 0,05) Solução estoque: NCs sonicados em água deionizada.....21

Figura 11 Índice de polidispersão (PdI) dos NCs em diferentes meios. (ANOVA-Turkey: ***p > 0,05).....22

Figura 12 Exemplo da lesão das células-tronco com 0h (A) e 24h (B) nos controles. Ambas figuras no aumento de 4x.....24

Figura 13 Análise de migração das CTM-TAs após 24h de tratamento comas amostras A (anatase), AR (anatase/rutilo), RA (rutilo/anatase) e RB (rutilo/broquita) (ANOVA – Tukey: **p < 0,005; *p: < 0,05).....25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Anatase
AR	Anatase/Rutilo
BSA	Bovine Serum Albumin
CTM	Células-tronco mesenquimais
CTM-TA	Células-tronco mesenquimais de tecido adiposo
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DLS	Dynamic Light Scattering
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ISCT	International Society for Cellular Therapy
LNMIS	Laboratório de Novos Materiais e Semicondutores
NCs	Nanocristais
PBS	Tampão Fosfato
Pdl	Índice de polidispersão
RA	Rutilo/Anatase
RB	Rutilo/Broquita
SFB	Soro Fetal Bovino
TiO2	Dióxido de Titânio

1. INTRODUÇÃO

1.1. Medicina Regenerativa

Medicina regenerativa é o ramo mais recente da ciência médica, que trata da restauração funcional de tecido específico e/ou órgão dos pacientes que sofrem de lesões graves ou doenças crônicas, no estado onde os corpos possuem respostas regenerativas que não são suficientes (MAHLA, 2016). A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa são ciências multidisciplinares que evoluíram paralelamente aos recentes avanços biotecnológicos (GIMBLE et al, 2007).

A combinação de biomateriais e fatores de crescimento podem permitir o uso de células-tronco para reparar danos nos tecidos e, eventualmente, substituir órgãos (MIZUNO et al, 2012). Para que as células-tronco possam ser utilizadas na medicina regenerativa, elas devem seguir alguns critérios (GIMBLE et al, 2007).

I. Serem encontradas em quantidades abundantes (milhões a bilhões de células);
II. Serem colhidas por um procedimento minimamente invasivo;
III. Podem ser diferenciadas ao longo de várias vias de linhagem celular de maneira regulável e reproduzível;
IV. Podem ser transplantadas com segurança e eficácia para um hospedeiro autólogo ou halogênico;
V. Podem ser processadas de acordo com as normas atuais da *Good Manufacturing Practice guidelines.*

Um total de 2.020 pesquisas de terapia celular em diferentes fases de ensaios clínicos utilizando células-tronco estão sendo realizadas no mundo. América do Norte e Europa concentram a maior quantidade de pesquisas nessa área. Ao analisar as pesquisas com células-

tronco na América do Sul, verificamos que o Brasil lidera com 29 diferentes ensaios clínicos do total de 36 na América do Sul (figura 1).

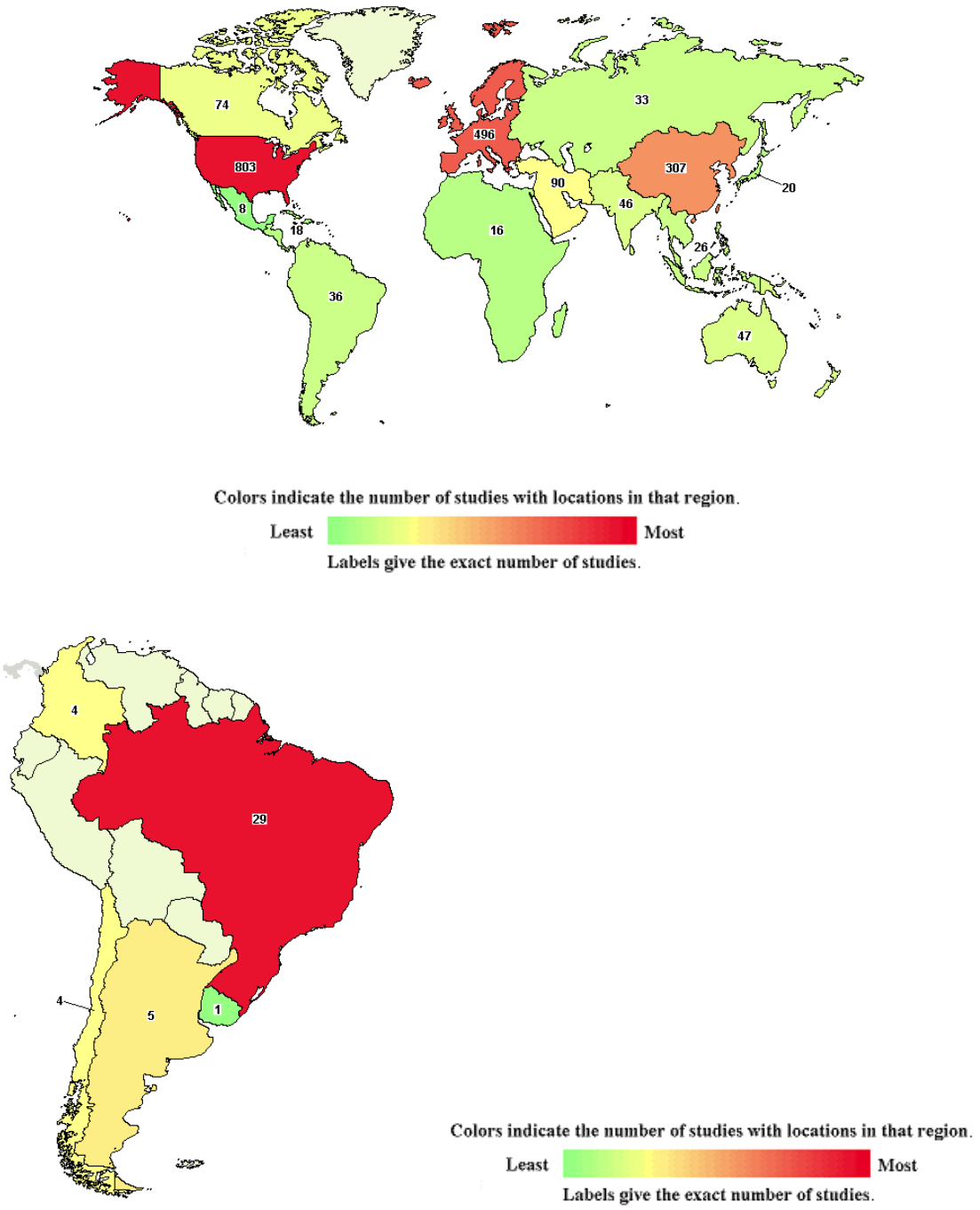


Figura 1: Número de pesquisas em diferentes fases de ensaios clínicos realizadas no mundo e na América do Sul utilizando células-tronco. As cores representam a quantidade de ensaios clínicos no local sendo o verde as menores quantidades e o vermelho as maiores quantidades de pesquisas no local (NIH US National Library of Medicine, 2019).

1.2. Células-tronco mesenquimais

Os estudos com células-tronco mesenquimais (CTMs) foram descritos pela primeira vez na década de 60, quando cientistas encontraram uma população de células aderentes isoladas da medula óssea com morfologia semelhante ao fibroblasto e capacidade de autorrenovação e diferenciação em outras linhagens (BARRY et al, 2004).CTMs são definidas como células-tronco adultas indiferenciadas que possuem a característica de autorrenovação, podendo ser isoladas de vários tecidos humanos, como tecido adiposo, cordão umbilical e medula óssea (CORNELIO, 2012).

Sabe-se que as CTMs podem se diferenciar em linhagens adipogênica, osteogênica, condrogênica, entre outras, devido à origem mesodérmica das células. A diferenciação realizada *in vitro* é induzida por meios seletivos, contendo fatores de indução específicos para cada linhagem. CTMs podem ser obtidas de diferentes áreas do corpo humano exibindo diferentes comportamentos, como por exemplo, as células-tronco de regiões abdominais superficiais sofrem menos apoptose comparadas com as células obtidas de tecidos mais profundos (ZIZHEN et al., 2019).

Eventualmente essas células se diferenciam e adquirem características fenotípicas específicas, que contribuem para sua função altamente especializada (CASTANHEIRA, 2009). Em 2006 a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) descreveu alguns critérios mínimos para que a célula seja considerada CTMs (DOMINICI et al., 2006):

- Capacidade de aderência à superfície plástica ao serem cultivadas *in vitro*;
- Presença de marcadores de superfície como: CD105, CD73 e CD90;
- Ausência de marcadores de superfície celular como: CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79α, CD19 ou HLA classe II e;
- Potencial de diferenciação em linhagens de adipócitos, condrócitos e osteoblastos.

O tecido adiposo é considerado uma fonte abundante e acessível para se obter um grande número de CTMs, uma vez que podem ser isoladas do tecido residual do procedimento de lipoaspiração. Estudos mostram que as células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM-TA) possuem um rendimento 500 vezes maior que as CTM obtidas de medula óssea(um grama de gordura rende aproximadamente 5.000 CTM-TA), quando comparadas aos demais isolamentos (GIMBLE et al, 2003; LIN et al, 2010). Além disso, a coleta nessa fonte é menos invasiva, quando comparada, por exemplo, a medula óssea, músculo, pele e líquido sinovial.

1.3. Nanomateriais associados as CTMs

O termo nanotecnologia foi definido pela primeira vez em 1974 por Richard Feynman, com o estudo da manipulação da matéria em escalas atômicas ou moleculares, desenvolvendo materiais, dispositivos e estruturas em escalas nanométricas (1 a 100nm) (BRAKMANE et al, 2012). Há um grande interesse científico na aplicação de nanomateriais associados as células-tronco, devido a facilidade dos métodos de preparação, biocompatibilidade, propriedades físicas e químicas únicas e sua eficiente interação com biomoléculas (DAYEM et al, 2018).

O tamanho reduzido proporciona aos nanomateriais características específicas como estruturas cristalinas, capacidade de adsorção, área de superfície de contato, agregação e aglomeração (SIQUEIRA, 2016). Estudos sugerem que os nanomateriais podem agir estimulando a diferenciação das células-tronco, penetrando ou não a membrana citoplasmática ou núcleo e podendo ativar vias de sinalização para transcrição de genes relacionadas a diferenciação celular (DE LIMA, 2017).

O dióxido de titânio (TiO2) é o óxido de titânio que ocorre naturalmente. Possui três estruturas cristalinas diferentes. Rutilo é a forma natural mais comum de TiO2, enquanto a anatase e broquita são dois polimorfos raros. Tem sido utilizado amplamente em pigmentos, representando 70% da produção total do volume de pigmentos em todo o mundo. Também

pode ser encontrado em produtos farmacêuticos e produtos cosméticos, como protetor solar (CHEN et al, 2014).

Uma nova perspectiva para a avaliação da biocompatibilidade de nanomateriais envolve a aplicação em CTMs no estudo de regeneração óssea. DE LIMA (2017) mostrou em seus resultados, que a associação de nanocristais de dióxido de titânio com CTMs aumentaram a mineralização óssea em testes *in vitro* (DE LIMA, 2017). Diversos estudos também mostraram que as CTMs têm capacidade de diferenciação osteogênica e são utilizadas para tratamentos terapêuticos, com a finalidade de melhorar os processos de regeneração tecidual, como por exemplo, o tecido ósseo sem o auxílio de enxertos, usando apenas CTMs e nanomateriais (TEXTOR et al, 2001; CORNELIO, 2012).

1.4. Migração Celular

Migração celular é um processo biológico complexo que é regulado por uma rede integrada de eventos bioquímicos e biomecânicos (TAY et al, 2013). As CTMs possuem capacidade de migrar para diversos tecidos, desde os primeiros estágios da embriogênese, quando elas migram para longas distâncias, estabelecem em novos locais e se especializam. Quando passam a ser células-tronco adultas, elas possuem propriedades de manter a homeostase do tecido e mediar o reparo e a regeneração tecidual (DE LUCAS, 2018)

O processo de migração ocorre quando o citoesqueleto de actina puxa as células à frente, enquanto a rede de microtúbulos é responsável pela retração traseira celular em uma sequência coordenada. Do ponto de vista biomecânico, as células exercem uma força de tração na matriz extracelular subjacente (ECM) impulsionando seu movimento (TAY et al, 2013).

O mecanismo que controla a migração de CTM-TA onde há lesão tecidual não é totalmente compreendido, no entanto, estudos mostram que essas células em ensaios com

animais reduzem a inflamação e promovem um processo de cicatrização aprimorado, que geralmente é bloqueado em feridas crônicas. Sabe-se que as CTM-TA possuem (KOKAI et al, 2014; MCCARTHY et al, 2018):

I. Receptores de superfície celular para fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico, que é liberado após dano tecidual e pode atuar como quimioatraente e;
II. Liberam citocinas e quimiocinas que levam à regeneração tecidual aprimorada.

O grande número de pessoas no mundo que podem ser beneficiadas com diferentes terapias celulares, justifica-se o uso das células-tronco associada a nanomateriais, como os nanocristais de dióxido de titânio, podem alterar a capacidade de migração das CTM-TAs, potencializando e auxiliando na eficácia do processo de regeneração tecidual, pois podem facilitar e agilizar a chegada das CTM-TAs no tecido alvo de terapia.

2. OBJETIVO

2.1. Analisar *in vitro* a capacidade de migração das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo associadas a nanocristais de Dióxido de Titânio em diferentes fases nas concentrações de 50µg/mL, 100µg/mL, 150µg/mL e 200µg/mL.

3. METODOLOGIA

3.1. Isolamento das CTM-TAs humano pelo método não-enzimático

As CTM-TAs foram adquiridas de cirurgia de lipoaspiração de paciente mediante assinatura do 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 UFU, deixado em repouso por 1 hora para que o material decantasse, separando na parte inferior o sangue e na parte superior o óleo. Em seguida foram retirados 15 ml de tecido adiposo (parte do meio), acrescentando 15 ml de soro fetal bovino (SFB), e centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos por 3 vezes. Após a terceira centrifugação, foram coletados fragmentos do tecido adiposo, colocado nos cantos das garrafas pequenas de cultura (25cm²) e cobertos com uma gota de SFB em cada fragmento. Depois de 24h, foi adicionado meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) baixa glicose com 20% de SFB. As células foram mantidas em uma incubadora umidificada a 37°C com 5% de CO_2. O meio foi trocado a cada dois dias até que as células atingissem 80-90% de confluência.

3.2. Caracterização das CTM-TAs

3.2.1. Análise de marcadores específicos de membrana

A caracterização foi realizada seguindo os critérios da International Society for Cellular Therapy (ISCT): aderência ao plástico, capacidade de diferenciação em 3 linhagens (osteogênica, adipogênica e condrogênica) e presença e ausência de marcadores específicos. Após confirmação da aderência das CTM-TAs ao plástico por microscopia, os marcadores negativos CD31 e CD45 e os marcadores positivos CD13, CD73, CD29, CD90 e CD44 foram analisados por imunofenotipagem utilizando a técnica de Citometria de fluxo (DOMINICI et al., 2006).

Para a Citometria de fluxo utilizou-se o protocolo com os CompBeads. As células aderentes foram destacadas com tripsina a 0,25% / EDTA, centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e ressuspendidas em PBS. Alíquotas contendo 1 x 10^6 de células foram incubadas com anticorpos monoclonais primários e incubados. Foi adicionado PBS1x/BSA1% /AZIDASÓDICA0,1% em cada tubo. Em seguida adicionou-se 1 gota cheia do BD ™ CompBeads Controle Negativo e 1 gota da BD ™ CompBeads Anti-Mouse IgG, κ para cada

tubo. Adicionou cada anticorpo pré-diluído e incubado os tubos testes e CompBeads por 30 minutos, sendo os tubos testes mantidos à 4°C e protegido da luz e as CompBeads à temperatura ambiente, também protegidas da luz. Em seguida centrifugou-se os tubos testes a 200x g por 5min, descartou-se o sobrenadante e foi adicionado 1 ml de PBS1x/ BSA1%/ AZIDASÓDICA0,1% nos tubos testes e nos tubos com CompBeads, foi lavado e centrifugado 200x g por 5min. Adicionou-se novamente o PBS1x/ BSA1%/ AZIDASÓDICA0,1% nos tubos testes e centrifugou 200x g por 5min. O sobrenadante foi descartado e em seguida ressuspendido os tubos testes e CompBeads em 200uL de PBS1x/BSA1%/AZIDASÓDICA 0,1% e foi feita leitura. Foram analisados os seguintes marcadores (tabela 1):

Nome	Isotipo
CD29 (Alexa Fluor ® 488)	Mouse IgG1, k Isotype Ctrl (FC) Antibody (Alexa Fluor ® 488)
CD13 (APC)	Mouse IgG1, k Isotype Ctrl Antibody (APC)
CD44 (PE/Cy7)	Mouse IgG1, k Isotype Ctrl Antibody (PE/Cy7)
CD90 (Thy1) (PE/Cy7)	Mouse IgG1, k Isotype Ctrl Antibody (PE/Cy7)
CD73 (Ecto-5'-nucleotidase) (APC)	Mouse IgG1, k Isotype Ctrl Antibody (APC)

Tabela 1: Marcadores positivos (CD13, CD73, CD29, CD90 e CD44) de CTM-TA, fluoróforos utilizados e seus respectivos isotipos.

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

3.2.2. Diferenciação celular

O plaqueamento das CTM-TAs para a diferenciação adipogênica foi realizado em 4 poços de tratamento e 4 poços de controle em uma placa de 24 poços, utilizando de $5x10^4$ células em cada poço. A diferenciação foi induzida utilizando o meio de cultura específico da marca Gibco. O meio de cultura foi trocado 2x por semana durante 21 dias. As placas foram lavadas

com PBS1x, e fixadas com formol, e em seguida as células foram submetidas a coloração por Vermelho Nilo e Hoechst.

Já para a diferenciação osteogênica utilizou-se uma placa de 96 poços com $2x10^4$ células por poço, sendo três poços de tratamento e três poços para o controle. O meio osteogênico foi preparado com ácido ascórbico, β-glicefosfato e dexametasona, e para as células do controle foi utilizado DMEM baixa glicose, 10% SFB.A troca dos meios foi realizada duas vezes por semana, por 21 dias. Após os 21 dias foi realizada a coloração utilizando alizarina red, que foi adicionada as células fixadas com formol após lavagem com PBS 1x.

Após a coloração, as placas foram analisadas no microscópio EVOS com fluorescência para determinar a capacidade de diferenciação osteogênica ou adipogênica.

3.3. Síntese e caracterização dos NCs de TiO2

Todos os NCs de TiO_2 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 TiO_2 foram sintetizados utilizando uma solução aquosa à temperatura ambiente. Inicialmente, foi preparada uma solução contendo 300 ml de água ultrapura e 60 ml de ácido nítrico (HNO_3, 70%, Sigma Aldrich), sob agitação magnética durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 60 ml de isopropoxido de titânio (Ti (OCH $(CH_3)_2$) 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 TiO_2. 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, resultado nas amostras como mostra a tabela abaixo (tabela 2).

Amostra	Temperatura	Tamanho	Composição
Anatase	100ºC	4,4 nm	100% anatase
Anatase/Rutilo (AR)	500ºC	8,5 nm	91,6% anatase e 8,94% rutilo
Rutilo/Anatase (RA)	650ºC	32 nm	35,44% anatase e 64,56% rutilo
Rutilo/Broquita (RB)	800ºC	44,1 nm	84,07% rutilo e 15,93% broquita

Tabela 2: Características de cada amostra dos NCs, quanto a temperatura de síntese, tamanho/diâmetro e composição.

3.4. Dispersão dos NCs de TiO_2

A dispersão dos NCs foi preparada utilizando uma solução estoque de NCs das fases anatase e anatase/rutilo 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 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, Carls bad, CA, Estados Unidos) suplementado com SFB (soro fetal bovino) a 10% (v/v), pH 7 para concentrações de 50μg/mL, 100μg/mL, 150μg/mL e 200μg/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 100μg/ml de BSA ao meio DMEM com SFB a 10% (RIBEIRO et al, 2016).

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 50, 100, 150 e 200μg/mL.

3.5. Ensaio de 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 (TAUROZZI et al, 2013).

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.

3.6. Migração Celular

Para o ensaio de migração celular, foram utilizadas $5x10^4$ das células-tronco de 4 passagens em cada poço, com meio de cultura DMEM baixa glicose contendo 10% SFB, totalizando 4placas com 15poços em cada placa de 24 poços (triplicata do controle e dos quatro tratamentos contendo diferentes concentrações das 4 fases do NCs): 50, 100, 150 e 200μg/mL). As células foram mantidas na estufa de CO_2 a 37ºC até atingirem a confluência de 90%.

Após atingirem a confluência, foi retirado o meio de cultura dos poços da placa, e adicionado o tratamento com os NCs de TiO_2, nas fases A, AR, RA e RB nas 4 diferentes concentrações: 50μg/mL, 100μg/mL, 150μg/mL e 200μg/mL. Nos poços de controle foi adicionado somente meio DMEM baixa glicose e 10% SFB.O tratamento ficou por 24h e em seguida foi feito uma lesão com uma ponteira de 200ul na posição vertical em todos os poços, 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. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento e caracterização das CTM-TAs

Após 3 a 4 semanas do isolamento mecânico e do cultivo celular, as células apresentaram formato fibroblastóide e aderência ao plástico conforme os requisitos de caracterização, sendo possível realizar o repique e expandi-las. A figura abaixo mostra a morfologia das células na segunda passagem utilizando a microscopia óptica Evos® no aumento de 4 e 10x.

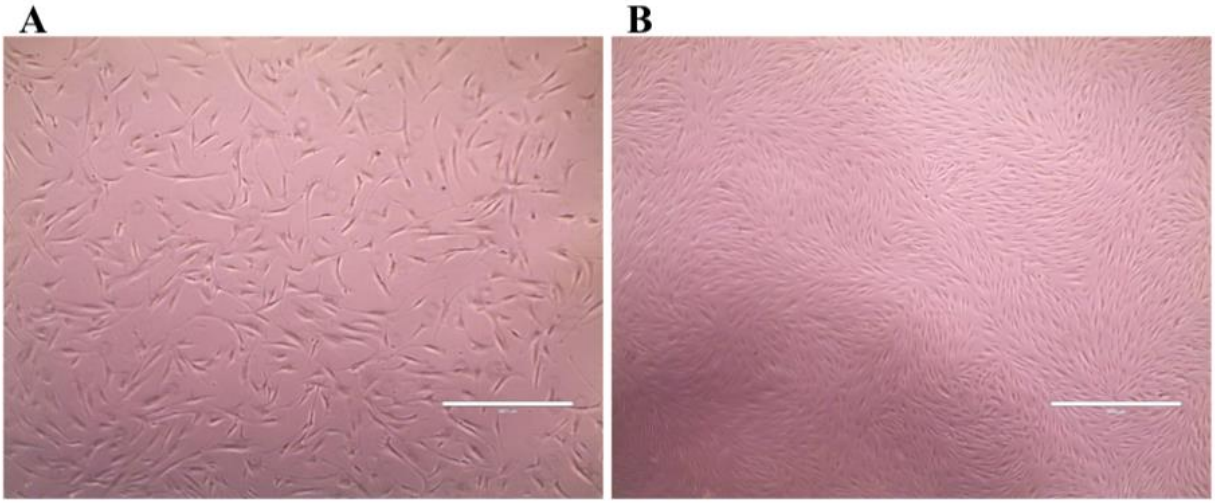


Figura 2: Morfologia das CTM-TA em segunda passagem: aderente e morfologia fibroblastóide. Fotografia obtida através de microscopia eletrônica nos aumentos de 10x **(A)** e 4x **(B)**, respectivamente.

Após o isolamento e expansão, foi realizada a caracterização por imunofenotipagem, analisando os marcadores positivos e negativos. A figura 3 mostra a seleção de CTM-TAs viáveis analisadas por SSC (SideScatter): ângulo de dispersão lateral que detecta a composição celular e FSC (ForwardScatter): ângulo de dispersão frontal que detecta o tamanho das células. A população de células analisadas na figura 4 apresentou 76,2% de CD29 e CD13 e 99,8% de CD44. Na figura 5 as CTM-TAS apresentaram 76,2% de CD73 e CD90, confirmando as características específicas de CTM-TA.

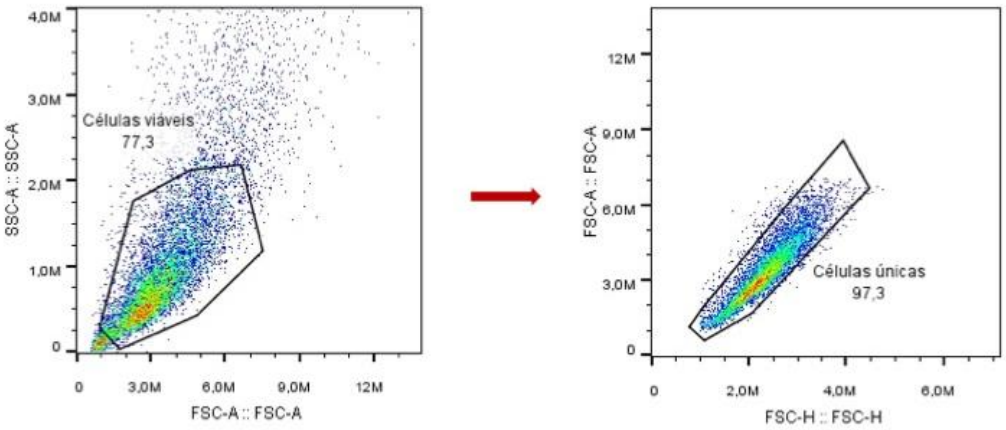


Figura 3 - Análise da viabilidade das células analisadas pela Citometria de Fluxo.

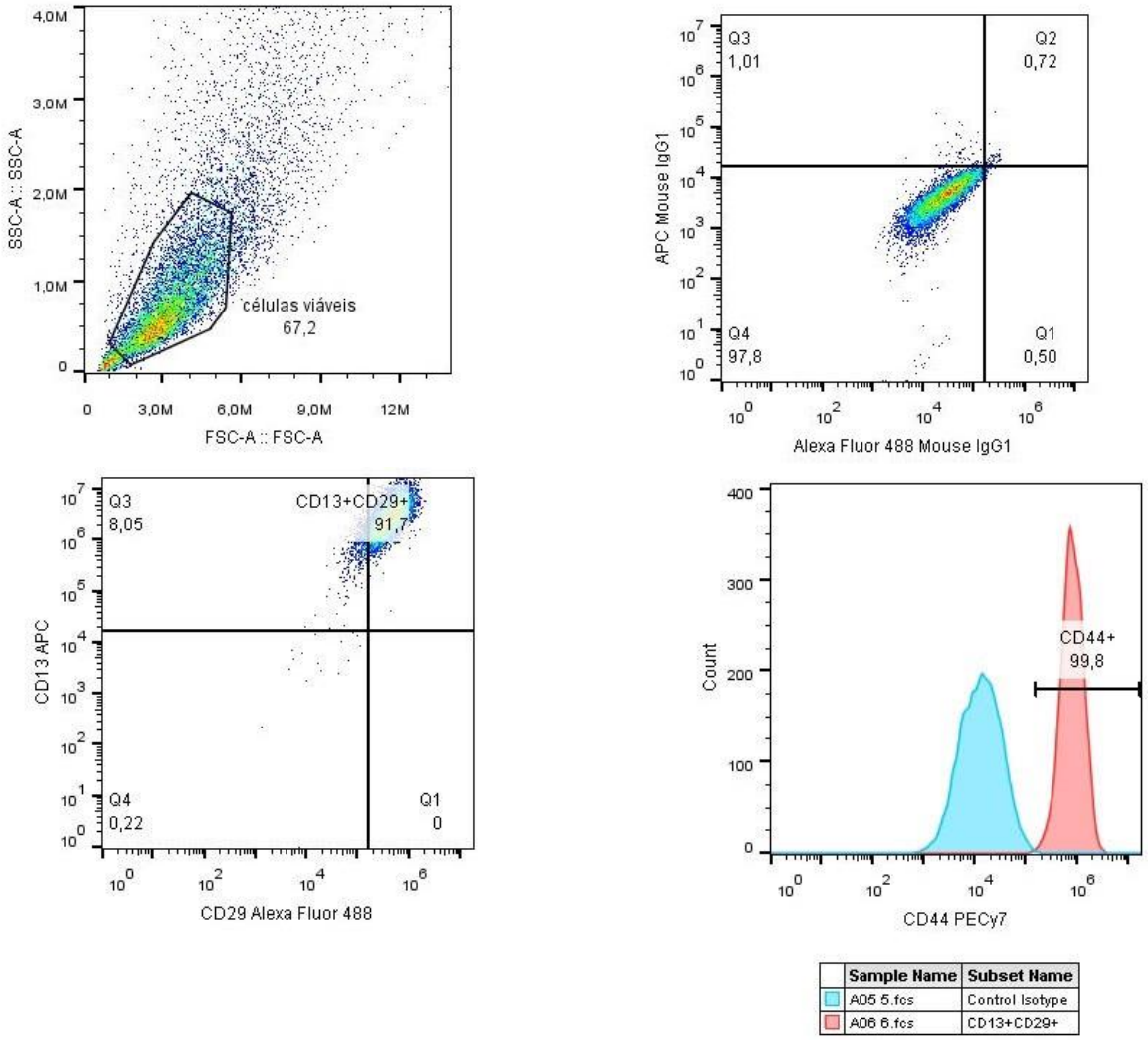


Figura 4 - Análise dos marcadores positivos CD13, 29 e 44 da população de CTM-TA por citometria de fluxo.

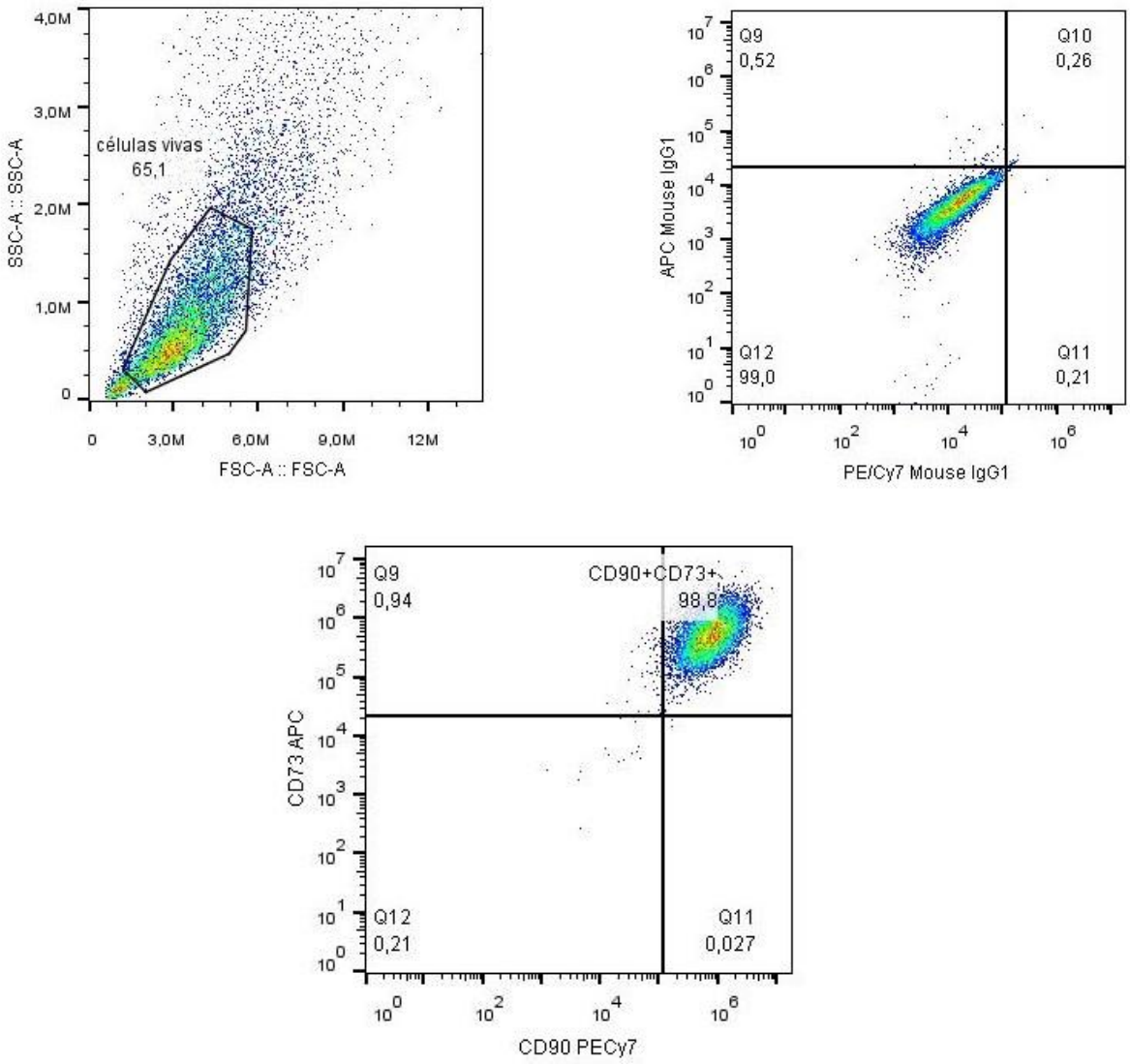
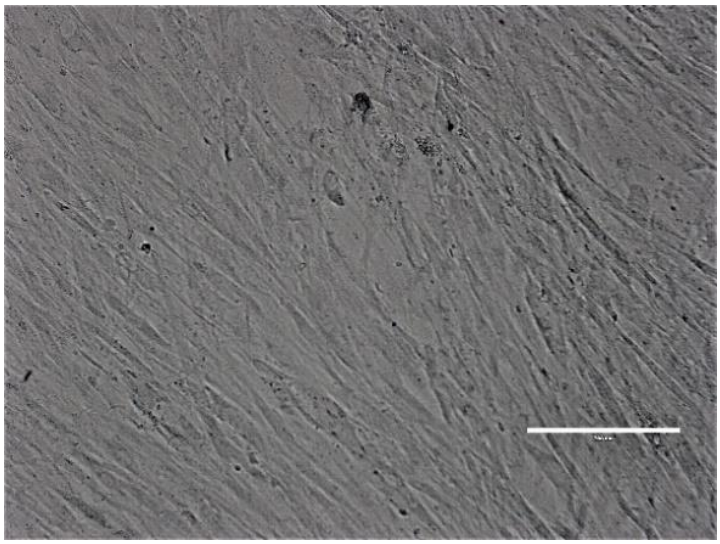


Figura 5 - Análise dos marcadores positivos CD79 e 90 da população de CTM-TA por citometria de fluxo.

Foi observado após 21 dias que as CTM-TA confirmam os critérios de caracterização ao apresentarem capacidade de diferenciação celular quando estimuladas com meios específicos para as diferenciações adipogênica e osteogênica, como mostram as figuras abaixo. As CTM-TAs foram analisadas com microscopia de fluorescência Evos® nos aumentos de 20x (figuras 6 e 7).

A 

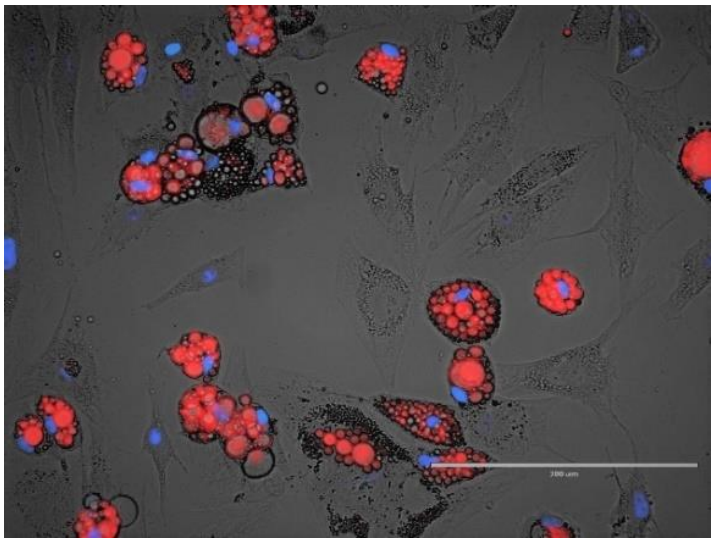
B 

Figura 6: Diferenciação adipogênica após 21 dias mostrando o controle (A) e as CTM-TAs diferenciadas (B), após coloração com o vermelho nilo marcando as células e hoechst marcando o núcleo, no aumento de 20x.

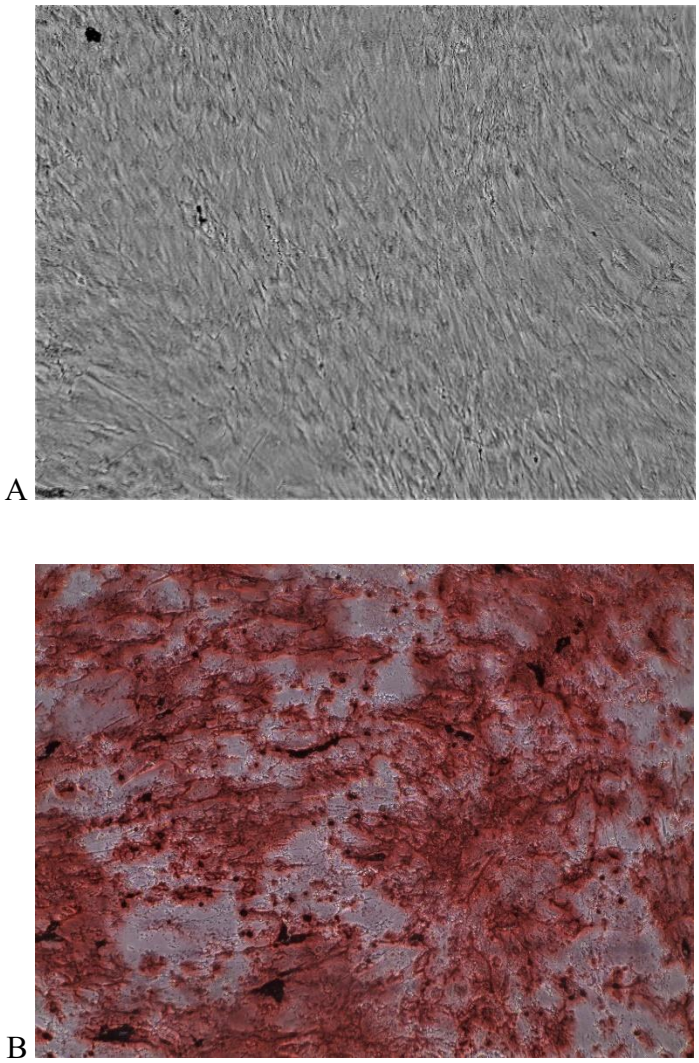


Figura 7: Diferenciação osteogênica após 21 dias mostrando o controle (A) e as CTM-TAs diferenciadas (B), após coloração com a alizarina red no aumento de 10x.

4.2. Síntese e caracterização dos Nanocristais de dióxido de titânio

A Figura 8 mostra os padrões XRD das amostras que foram submetidas as temperaturas e tempos de 100º /24h, 500º C/1h, 650º C/1h e 800º C/1h. Os padrões das características da difração TiO_2 em anatase (JCPDS: 1: 21-1272), rutilo (JCPDS: 1: 21-1276) e fase de broquita (JCPDS: 29-1360) foram representados pelos símbolos (*), (**) e (***), respectivamente. A temperatura de 100° C observou-se somente nanocristais na fase cristalina anatase. O aumento da temperatura de 100° C para 500° C é um fator crucial para transformação da fase

de anatase para rutilo, como mostrado na tabela 2, mas à temperatura de 650° C essa transformação é mais evidente. A presença de fase de broquita é frequentemente observada como subproduto quando a precipitação é realizada em um meio ácido (POTTIER et al., 2001; ABBAS et al., 2011). Com o aumento da temperatura para 800°C / 1h, observou-se que 16% da fração dos nanocristais eram de broquita.

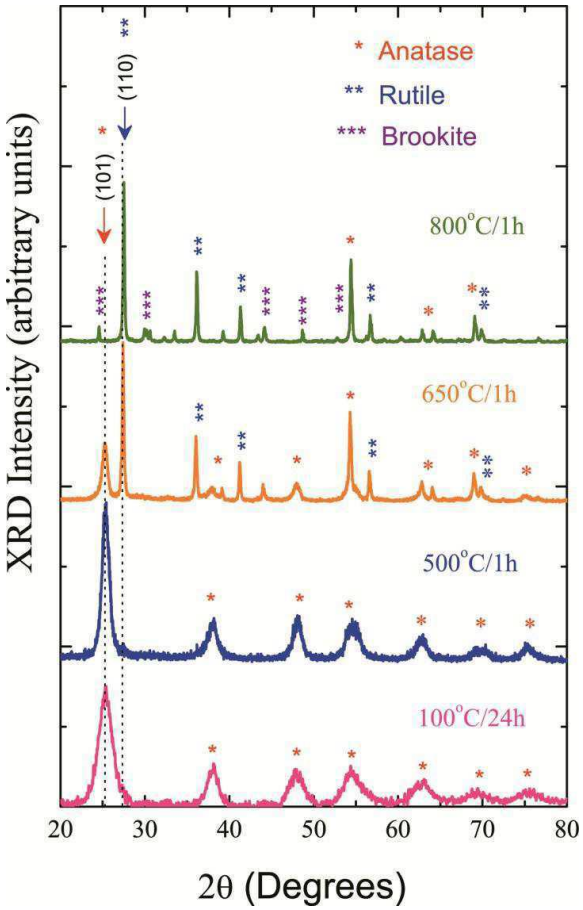


Figura 8- Padrões XRD das amostras sujeitas a técnicas de recozimento a100ºC / 24h, 500ºC/ 1h, 650º C / 1h e 800ºC / 1h.

A Figura 9 mostra os espectros de micro-Raman de NCs de TiO2 sujeitos a aquecimento térmico de 100ºC / 24h, 500ºC / 1h, 650ºC / 1h e 800ºC / 1h. Todos os espectros foram normalizados até o pico de maior intensidade, de modo a facilitar a visualização dos modos ativos micro-Raman. Há bandas de Raman com vibrações características de nanocristais de TiO_2 de fase anatase para a amostra sob a temperatura de 100ºC / 24h. O espectro Raman de um único cristal de anatase possui seis modos permitidos a 144 cm-1 (Eg),

197 cm-1 (Eg), 399 cm -1(B1g), 513 cm- 1 (A1g), 519 cm -1 (B1g) e 639 cm-1 (Temperature Dependence of the Raman Spectrum in Anatase TiO2, 1980; ZHANG et al., 2000).

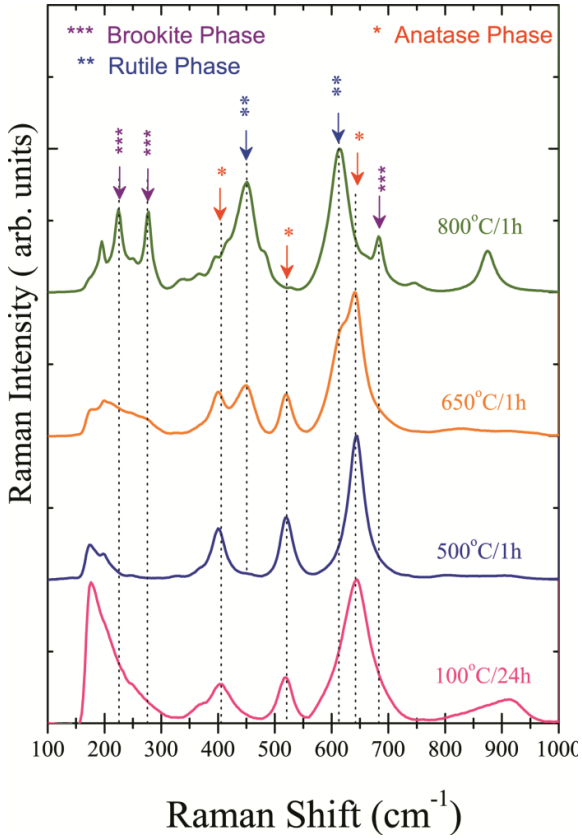


Figura 9- Espectro Micro Raman de NCO de TiO2 sujeitos a 100ºC / 24h, 500ºC / 1h, 650ºC / 1h e 800ºC / 1h.

A banda Raman em torno de 144 cm-1 não foi visualizada porque o detector do sistema Raman usado para detectar foi da faixa de 150-1000 cm-1. Nos espectros de micro-Raman das amostras com aquecimento térmico a 500ºC/1h, há também os modos vibracionais da fase anatase. No entanto, havia uma pequena banda em cerca de 450 cm-1 associada a um modo vibracional de fase rutilo. Com o aumento da temperatura térmica para 650ºC / 1h ocorreu a transformação da fase de anatase em rutila e há algumas modificações no espectro de NC de TiO_2. Essas mudanças estão relacionadas à transformação de anatase em fase de broquita, em excelente concordância com os resultados XRD (Figura 6). Nos espectros de NCT de TiO_2 sob a temperatura de 800 ° C / 1h existem modos de vibração da fase de broquita. Esses resultados confirmam a presença de fase de broquita, uma vez que a presença

desta fase nos padrões XRD não está muito bem exibida. Portanto, baseados nos resultados de XRD e micro-Raman, pode-se concluir que os NCs de TiO_2 são de alta pureza e exibem diferentes fases em função do tratamento térmico.

4.3 Análise do DLS

Após a dispersão dos NCs de TiO_2 utilizando desintegrador ultrassônico, 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 ultrapura, 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 3).

TiO_2 NCs Amostra	**Tamanho Água Ultrapura**	**Tamanho DMEM+SFB+ BSA**
A (anatase)	269,8 nm	231,46 nm
AR (anatase+rutilo)	399,7 nm	216,6 nm
RA (rutilo+anatase)	184,16 nm	239,96 nm
RB (rutilo + brookita)	304,9 nm	255,6 nm

Tabela 3 – 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.

Com as medições de cada análise (água ultrapura e meio completo), observou-se a maior instabilidade dos NCs quando sonicados em água ultrapura, devido a sua variação no tamanho dos aglomerados. Quando sonicadas em meio completo verificou-se uma maior

estabilidade independentemente do tipo de NCs 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. 10).

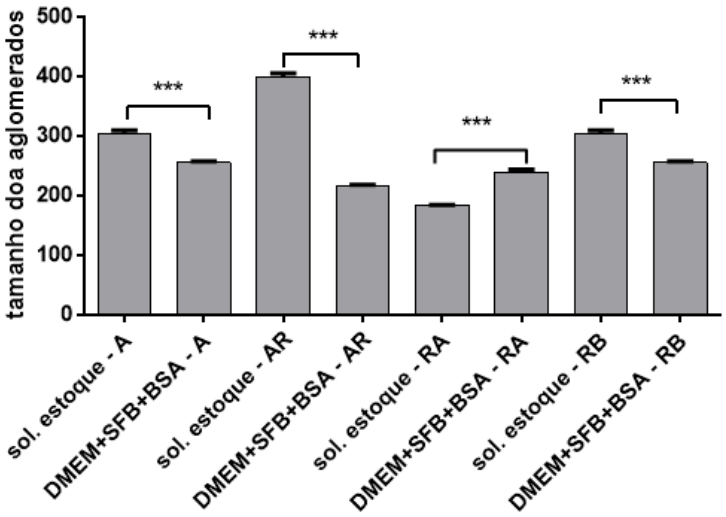


Figura 10 – Tamanho dos aglomerados (nm) de NCs de TiO2 das 4 amostras quando sonicadas em água ultrapura e em meio completo. (ANOVA-Turkey: ***p > 0,05) Solução estoque: NCs sonicados em água deionizada.

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 se apresentam monodispersos, ou seja, com alta homogeneidade (ZHANG et al, 2007). Analisando o Pdl observou-se algumas diferenças entre as amostras de NCs e diferentes meios, conforme a Tabela 4 e o gráfico da figura 11.

Índice de polidispersão (Pdl)	Água Ultrapura	DMEM+SFB+ BSA
A	0,41	0,27
AR	0,42	0,47
RA	0,13	0,33
RB	0,42	0,20

Tabela 4: Valores do Pdl (nm) nas 4 amostras de NCs em água ultrapura e meio completo (DMEM+SFB+BSA).

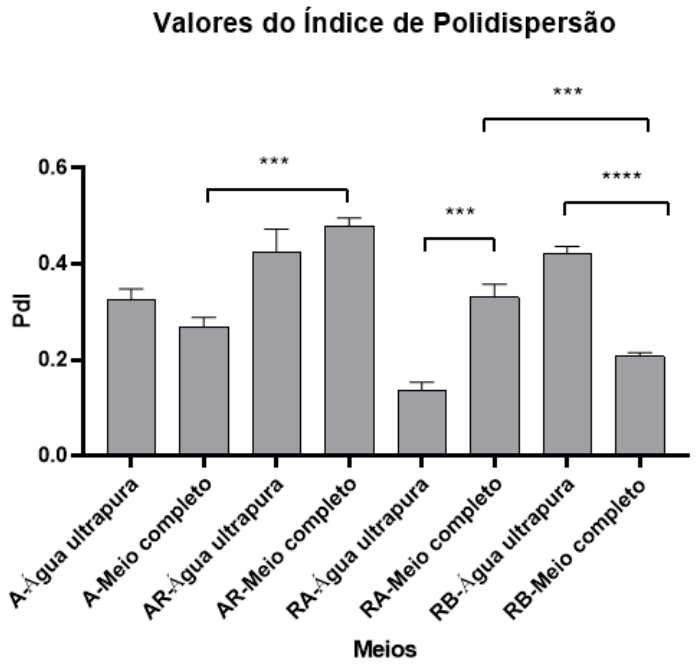


Figura 11: Índice de polidispersão (PdI) dos NCs em diferentes meios. (ANOVA-Turkey: ***p > 0,05).

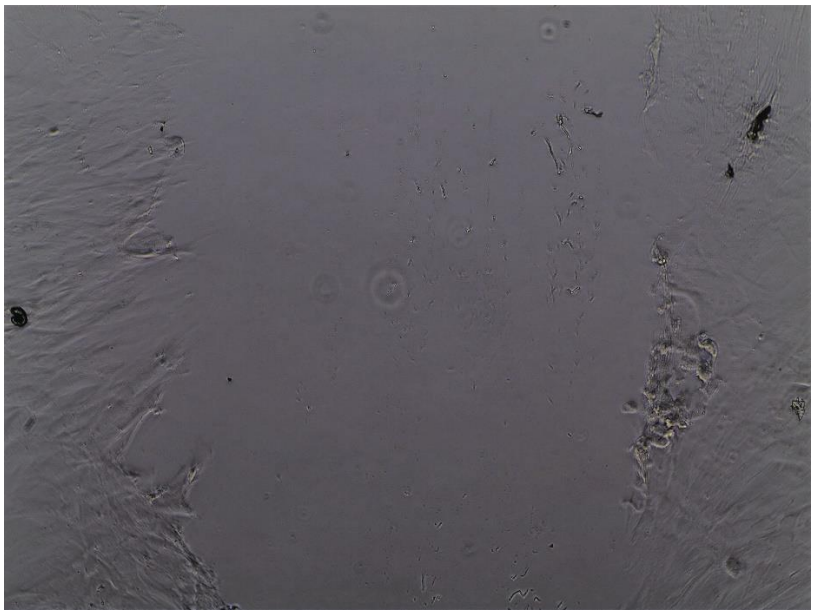
Nestes resultados verificou-se que as amostras RA e RB apresentaram o menor Pdl em meio de cultura completo, significando que possuem maior homogeneidade, assim tendo maior estabilidade física destes NCs podendo na2o causar danos nas células.

O ensaio do DLS (Dynamic Light Scattering) 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

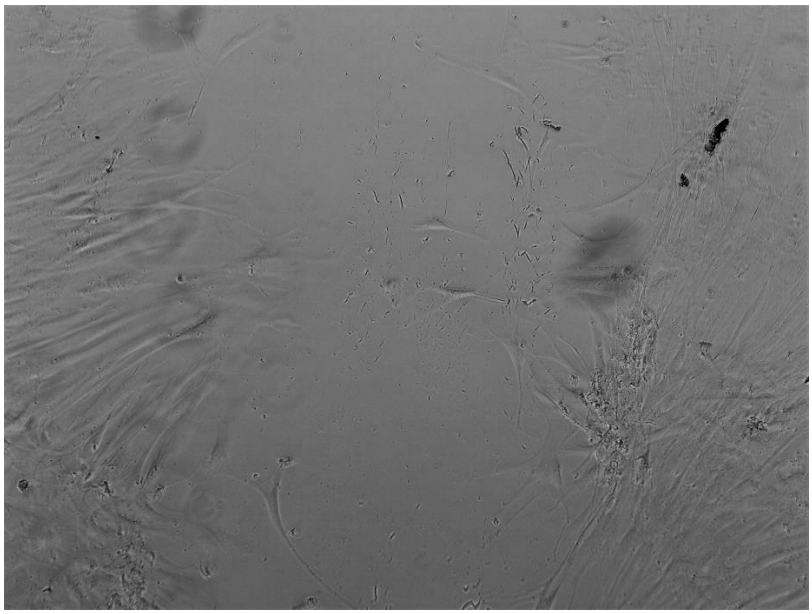
materiais com diferentes dimensões. Assim, pode-se dizer que as propriedades dos nanomateriais de uma determinada substância dependem também do tamanho, pois determinam seu comportamento, podendo ser totalmente diferente, como se tratasse de uma nova substância (STUCCHI et al., 2018), principalmente quando na presença ou ausência de soro, pois ele modula a eficiência de internalização e os efeitos adversos desses NCs (SHARMA et al, 2019).Os resultados referentes a amostra RB se destacaram porque os seus aglomerados dispersos em meio completo apresentaram uma maior estabilidade, o que é extremamente importante na sua associação às CTM-TAs com finalidades terapêuticas.

4.4 Migração Celular

No ensaio de migração celular foi observado o comportamento das CTM-TAs com os tratamentos dos NCs de TiO_2 após 24 horas. Foi verificado que as amostras RB, contendo maior quantidade de rutilo, na concentração de 50μg/ml aumentaram significativamente a migração celular, fechando em torno de 80% a lesão, enquanto os tratamentos com os NCs A, AR e RA, o fechamento ficou entre 20 a 40% após 24 h. Os NCs RA aumentaram significativamente a migração das CTM-TAs na concentração de 50μg/ml quando comparados a ação do NCs na concentração de 150μg/ml. No entanto, os NCs contendo anatase não alteraram a migração celular (Figura 13).



(A)



(B)

Figura 12 – Exemplo da lesão das células-tronco com 0h (A) e 24h (B) nos controles. Ambas figuras no aumento de 4x.

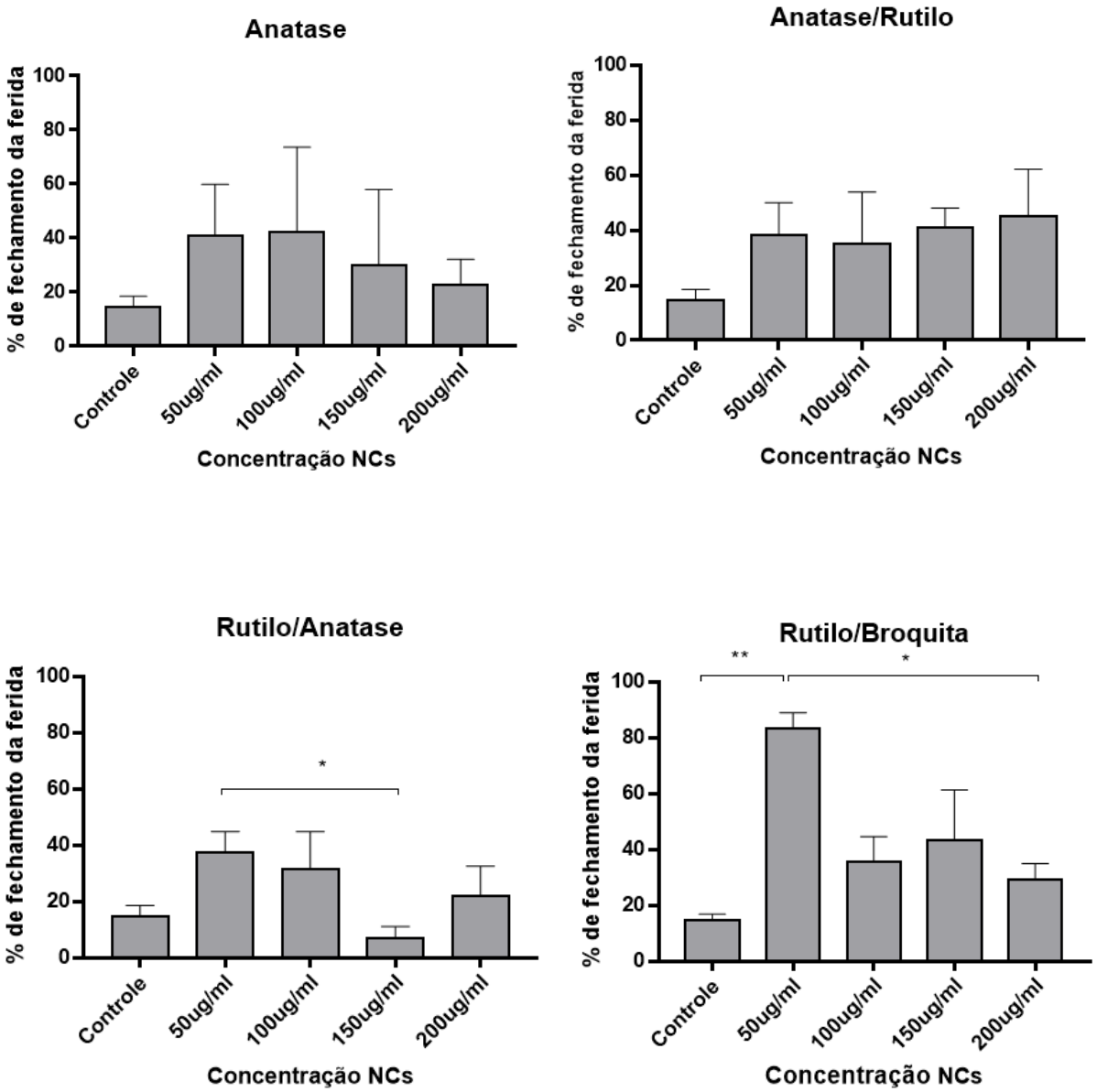


Figura 13: Análise de migração das CTM-TAs após 24h de tratamento comas amostras A (anatase), AR (anatase/rutilo), RA (rutilo/anatase) e RB (rutilo/broquita) (ANOVA – Tukey: **p < 0,005; *p: < 0,05).

Os resultados obtidos mostram que a fase anatase não afetou a migração celular negativamente como se esperava, pois, estudos com fibroblastos de murino tratados com os NCs de TiO_2 realizados por Jin (2008) mostraram que a anatase apresenta alta toxicidade (JIN, 2008). Acredita-se que isso ocorreu devido ao modo de preparo dos NCs de TiO_2 utilizando a metodologia de Carvalho (2016), mostrando que a agregação e dispersão desses NCs quando utilizado o BSA, não afetaram diretamente as células.

Estudos mostram que menores concentrações dos NCs são melhores, visto que altas concentrações de NCs podem interferir diminuindo a migração celular (MIHAI, 2019), como observado nos resultados desta pesquisa nos tratamentos utilizando RA numa concentração de 150μg/mL e RB em uma concentração de 200μg/mL. LI, 2019 mostra que estudos com CTM e nanopartículas de óxido de ferro na concentração de 50μg/mL apresentam um aumento da migração celular, promovendo também uma migração mais rápida em locais de lesões. Esses resultados estão de acordos com a deste trabalho, visto que RB a 50μg/mL teve 80% no fechamento da ferida.

5. CONCLUSÃO

A migração de CTM-TA *in vitro* aumenta quando tratada com NCs de TiO_2 na fase rutilo/broquita na concentração de 50μg/mL.

Esse trabalho abre perspectivas futuras para que se possa testar o modo de preparo com BSA e fazer novos testes utilizando a fase rutilo/broquita.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Z. et al. Synthesis, characterization and particle size distribution of TiO2 colloidal nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 384, n. 1, 2011/07/05/, p. 254-261. 2011

AHEARNE, M., et al. **Mechanical Characterisation of Hydrogels for Tissue Engineering Applications.** Topics in Tissue Engineering, Vol. 4. Cap 12. 16f. 2008.

BARRY, F.P., et al. **Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization: Review.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. Vol 36. P. 568–584. 2004.

BRAKMANE, G., et al.**Systematic review: the applications of nanotechnology in gastroenterology**. AlimentaryPharmacologyandTherapeutics. 9f. 2012.

CARVALHO, K.P., et al. **Optimized method of dispersion of titanium dioxide nanoparticles for evaluation of safety aspects in cosmetics**. Journal of Nanoparticle Research. 14f. 2016.

CASTANHEIRA, P. **Estudo Comparativo Da Migração, Integração E Diferenciação De Células-Tronco Mesenquimais, Provenientes De Diferentes Fontes, Em Tecido Retiniano Lesado.** 2009. 90f. Dissertação (Doutorado em Bioquímica e Imunologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2009.

CHEN, T., et al.**Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles: Review**. Journalof Food and Drug Analysis. p. 95-104. 2014.

CLEMENT, L., et al. **Toxicity of TiO2 nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants – Effects of size and crystalline structure**. Chemosphere. p. 1083-1090. 2013.

CORNÉLIO, D. A. **Análise da estabilidade genética de células-tronco mesenquimais humanas.** 2012. 174 f. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

DAYEM, A.A., et al. The **Impact of Metallic Nanoparticles on Stem Cell Proliferation and Differentiation: Review.** Nanomaterials. 32f. 2018.

DE LIMA, I. L. **Potencial de Diferenciação Óssea das Células-Tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo Humano Associadas à Nanopartículas de Dióxido de Titânio.** 2017. 77f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais. 2017.

DE LUCAS, B., et al. **Importance and regulation of adult stem cell migration.** Espanha. J. Cell. Mol. Med. Vol 22, No 2, pp. 746-754. 2018.

DOMINICI, M., et al. **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement**. Cytotherapy. Vol 8. Nº4. 315-317. 2006.

GIMBLE, J.M., et al. **Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential.** Cytotherapy. Vol 5. Nº 5. 362-369. 2003.

GIMBLE, J. M., et al. **Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine**. Circulation Research. 24f. 2007.

JIN, C.Y., et al. **Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles in Mouse Fibroblast Cells**. Chemical Research in Toxicology. 21, 1871–1877. 2008.

KOKAI, L.E., et al. **Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration**. Translational Research. Vol 163. p. 399-408. 2014.

LI, X., et al. **Iron oxide nanoparticles promote the migration of mesenchymal stem cells to injury sites**. International Journal of Nanomedicine. p. 573-589. 2019.

LIN, C.S., et al. **Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture: Review.** Histology and Histopathology. 9f. 2010.

MAHLA, R.S. **Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics: Review.** International Journal of Cell Biology. 24f. 2016.

MCCARTHY, M. E., et al. **Therapeutic Applications for Adipose-Derived Stem Cells in Wound Healing and Tissue Engineering**. Current Stem Cells Reports. Vol 4. p. 127-137. 2018.

MIHAI, M.M., et al. **Nanomaterials for Wound Healing and Infection Control: Review.** 2019. Materials. 16f. 2019.

MIZUNO, H., et al. **Adipose-Derived Stem Cells as a Novel Tool for Future Regenerative Medicine: Review**. Stem Cells Journals. Vol 30. No 5. p 804-810. 2012.

NIH US National Library of Medicine. (2019). Disponível em <www.clinicaltrials.gov> acessado em 08/11/2019.

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

RIBEIRO, A.R., et al. **Trojan-Like Internalization of Anatase Titanium Dioxide Nanoparticles by Human Osteoblast Cells**. Scientific Reports. 11f. 2016.

SHARMA, S., et al., **Fueling a Hot Debate on the Application of TiO2 Nanoparticles in Sunscreen**.Materials (Basel). 12(14). 2019.

SIQUEIRA, P.R.**Efeitos da exposição à nanopartícula de dióxido de titânio em hepatócitos de peixe zebra (*daniorerio*, hamilton, 1822). Uma abordagem in vitro.**2016. 57f. Dissertação (Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.2016.

STUCCHI, M., et al., **Ultrasound assisted synthesis of Ag-decorated TiO2 active in visible light.**Ultrason Sonochem**. 40**(Pt A): p. 282-288.2018.

TAGA, R., et al. **Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação deosseobond.** Revista Brasileira de Implantodontia, 1997. 3 (1): p. 13-20.

TAUROZZI, J.S., V.A. Hackley, and M.R. Wiesner, **A standardised approach for the dispersion of titanium dioxide nanoparticles in biological media.** Nanotoxicology. 7(4): p. 389- 401. 2013.

TAY, C.Y., et al. **Nanoparticles Strengthen Intracellular Tension and Retard Cellular Migration**. Nanoletters. p, 83-88. 2013.

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.** Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 171-230. 2001.

ZHANG, W. F. et al. Raman scattering study on anatase TiO 2 nanocrystals. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 33, n. 8, p. 912. 2000.

ZHANG, L. and S.L. Kosaraju, **Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants**. European Polymer Journal. 43(7): p. 2956-2966. 2007.

ZIZHEN, S., et al. **Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapie**s. Biomedicine & Pharmacotherapy. 6f. 2019.