



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOQUÍMICA**

**Nanocristais de Dióxido de Titânio (TiO_2) na fase Rutila/Anatase auxiliam na
proliferação e migração *in vitro* de células MC3T3.**

Aluno: Loyna Nobile Carvalho

Orientador: Vivian Alonso Goulart

Co-Orientador: Leticia de Souza Castro Filice



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOQUÍMICA**

**Nanocristais de Dióxido de Titânio (TiO_2) na fase Rutila/Anatase auxiliam na
proliferação e migração *in vitro* de células MC3T3.**

Aluno: Loyna Nobile Carvalho

Orientador: Vivian Alonso Goulart

Co-Orientador: Leticia de Souza Castro Filice

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



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOQUÍMICA**

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

C331 2023	Carvalho, Loyna Nobile, 1997- Nanocristais de Dióxido de Titânio (TiO₂) na fase Rutila/Anatase auxiliam na proliferação e migração in vitro de células MC3T3 [recurso eletrônico] / Loyna Nobile Carvalho. - 2023. Orientador: Vivian Alonso-Gourlat. Coorientador: Letícia de Souza Castro-Filice. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.262 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Genética. I. Alonso-Gourlat, Vivian, 1969-, (Orient.). II. Castro-Filice, Letícia de Souza, 1973-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título. CDU: 575
--------------	--

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



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOQUÍMICA**

**Nanocristais de Dióxido de Titânio (TiO_2) na fase Rutila/Anatase auxiliam na
proliferação e migração *in vitro* de células MC3T3.**

ALUNO: Loyna Nobile Carvalho

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Vivian Alonso Goulart (Orientador)

Examinadores: Lorraine Braga Ferreira

Isabela Lemos de Lima

Data da Defesa: 29/06/2023

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

Vivian Alonso Goulart



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



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico/PPGGB				
Data:	Vinte e nove de junho de dois mil e vinte e três	Hora de início:	09:00h	Hora de encerramento:	09:30h
Matrícula do Discente:	12022GBI013				
Nome do Discente:	Loyna Nobile Carvalho				
Título do Trabalho:	Nanocristais de Dióxido de Titânio (TiO ₂) na fase Rutila/Anatase auxiliam na proliferação e migração <i>in vitro</i> de células MC3T3.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Nanobiotecnologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Nanobiotecnologia associada a células-tronco.				

Aos vinte e nove dias do mês de junho de dois mil e vinte e três, às 09:00 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma *Cisco Webex*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Vivian Alonso Goulart (Orientadora), Lorraine Braga Ferreira e Isabela Lemos de Lima. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Vivian Alonso Goulart apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor (a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(A) PROVADO.

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

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



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Alonso Goulart, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/06/2023, às 09:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isabela Lemos de Lima, Usuário Externo**, em 29/06/2023, às 10:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lorraine Braga Ferreira, Usuário Externo**, em 29/06/2023, às 10:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4536125** e o código CRC **00A7D0CF**.

DEDICATÓRIA

“What is a person, if not the marks they leave behind?” - V. E. Schwab, The Invisible Life of Addie LaRue.

Dedico esse trabalho à todas as mulheres que impactaram o mundo da ciência... De Rosalind Franklin até Henrietta Lacks (HeLa), cada mulher que mudou a história e que de alguma forma foi minha inspiração para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família por todo o suporte em todos esses anos. Aos meus pais que sempre acreditaram em mim e nunca deixaram de me apoiar e ao meu irmão que sempre foi e sempre será meu melhor amigo. Ao Nicholas que ouviu todas as reclamações e sempre foi meu maior incentivador e não deixou eu desistir em nenhum momento.

Eu não poderia ter escolhido melhores orientadoras do que a Vivian e a Letícia. Obrigada por todos os ensinamentos tanto científicos quanto para vida toda.

Lucas que foi e sempre será meu melhor parceiro de laboratório porque eu não teria conseguido chegar até aqui sem você. Agradeço a Gabi por toda ajuda e por ter completado o nosso trio (predileto).

Aos meus colegas do laboratório de Nanos que me ajudaram todos esses anos, mas principalmente a Natassia que com certeza me fez ser uma profissional melhor.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	1
CAPÍTULO I.....	2
1. Medicina Regenerativa	2
2. Nanotecnologia.....	4
3. Referências Bibliográficas	7
 CAPÍTULO II	 10
Resumo	10
Abstract.....	11
1. Introdução... ..	12
2. Metodologia... ..	13
3. Resultados e discussão.....	16
4. Conclusão.....	23
5. Referências Bibliográficas.....	23

APRESENTAÇÃO

A medicina regenerativa é um dos campos mais importantes do século XIX, juntamente com o desenvolvimento de biomateriais em nanoescala. A combinação de células e nanomateriais pode trazer benefícios como a regeneração tecidual. O dióxido de titânio é um metal bem estudado com inúmeras aplicações devido às suas propriedades únicas em comparação com outros metais, porém sabe-se que esse metal pode causar toxicidade e podem acumular em diferentes órgãos do corpo. Portanto, essa pesquisa teve como objetivo avaliar a citotoxicidade do dióxido de titânio *in vitro* além de avaliar a proliferação e migração celular.

O objetivo do capítulo I é fornecer uma fundamentação teórica para os tópicos de medicina regenerativa, nanotecnologia, dióxido de titânio e cicatrização de feridas. Já o capítulo II apresenta o artigo e resultados dessa pesquisa.

CAPÍTULO I

1. MEDICINA REGENERATIVA

A perda de tecido, falência de órgãos e deformidades congênitas, são tratadas há anos com transplante de órgãos/tecidos, uso de aloenxertos, dispositivos sintéticos, mas essas terapias têm limitações como falta de doadores, rejeição imunológica, reações alérgicas e procedimentos cirúrgicos invasivos (MIZUNO et al., 2012; KORIA, 2012). Uma abordagem para solucionar tais problemas é o uso da medicina regenerativa, que tem como objetivo reparar, regenerar e substituir órgãos e tecidos por meio da combinação de células, biomateriais e a biologia molecular visando restabelecer funções normais do corpo (SAMPOGNA et al., 2015).

A lesão tecidual é causada por algum estímulo que interrompe a continuidade física dos tecidos funcionais. Alguns fatores que podem causar lesões internas ou externas são estímulos físicos, químicos, elétricos ou térmicos e também podem danificar organelas específicas ou células. O processo de reparo de feridas pode ser dividido nas seguintes etapas, que podem ocorrer simultaneamente durante a cicatrização tecidual: hemostasia, recrutamento de células inflamatórias, proliferação celular e por fim, a remodelação (GONZALEZ et al., 2016; GUILLAMAT-PRATS, 2021).

A hemostasia é a primeira etapa do reparo tecidual, onde os vasos sanguíneos lesionados se contraem e a ativação da cascata de coagulação permite a agregação de trombócitos e plaquetas em uma rede de fibrina, o que é essencial para formar uma barreira contra a invasão de microrganismos, além de organizar a matriz temporária necessária para a migração celular, que por sua vez restaura a função da pele como barreira protetora, preservando a integridade da pele. Também permite a migração celular para o microambiente da ferida e estimula a proliferação de fibroblastos (GONZALEZ et al., 2016; GUILLAMAT-PRATS, 2021).

Na fase inflamatória é essencial o recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão, para que possam remover as células danificadas por patógenos. Os leucócitos recrutados para essa área secretam fatores de crescimento, enzimas e quimiocinas que produzem inchaço, calor, vermelhidão e dor, que são os clássicos sinais de inflamação. Se o recrutamento dos leucócitos for prolongado e um número excessivo de células ativadas se acumulam no local da lesão, o processo de cicatrização será afetado devido à inflamação (GUILLAMAT-PRATS, 2021).

A fase proliferativa inicia-se nas primeiras 72 horas da inflamação e pode durar até 14 dias após o início da lesão. O objetivo dessa fase é substituir a matriz provisória da hemostasia reduzindo a área de superfície do tecido lesionado, substituído por tecido de granulação, enfatizando células como fibroblastos, que contribuem para a contração das extremidades da lesão migrando em direção às respostas de citocinas e fatores de crescimento, juntamente com granulócitos, macrófagos, feixes de colágenos formando uma estrutura epitelial viável (GONZALEZ et al., 2016; NEGUT et al., 2020; GUILLAMAT-PRATS, 2021).

A fase de remodelação começa no final do desenvolvimento do tecido de granulação formado na fase proliferativa e pode durar de 21 dias a anos, dependendo da cicatrização. Nesta fase, fibroblastos são diferenciados em miofibroblastos que participam na produção da matriz extracelular e da força mecânica. O colágeno tipo III produzido rapidamente na matriz extracelular é substituído pelo colágeno I, que tem maior resistência flexibilidade promovendo epitelização e neovascularização (GONZALEZ et al., 2016; NEGUT et al., 2020; GUILLAMAT-PRATS, 2021).

Células-tronco são uma das principais células do corpo humano devido ao seu grande potencial de autorrenovação, por serem células indiferenciadas capazes de se diferenciar em mais de 200 tipos celulares. A classificação das células tronco são baseadas na capacidade de diferenciação celular sendo classificadas em 5 grandes grupos (FALZARANO, et al., 2019; RAJABZADEH, et al., 2019):

- As totipotentes são capazes de se diferenciar em qualquer outra célula no organismo e conhecidas por formarem células do tecido embrionário e extraembrionário;
- As pluripotentes conhecidas como células embrionárias podem se diferenciar em quase todos os tipos celulares, mas não conseguem formar um embrião completo;
- As multipotentes são conhecidas como células-tronco adultas e diferente das outras duas citadas elas possuem uma menor capacidade de diferenciação, um exemplo são as células-tronco de medula óssea e de tecido adiposo;
- As células-tronco oligopotentes são células progenitoras que se diferenciam em tipos de células de uma única linhagem;
- As células-tronco unipotentes são as que possuem uma menor capacidade de diferenciação, uma vez que elas geram novas apenas do tecido de origem como as células do osso.

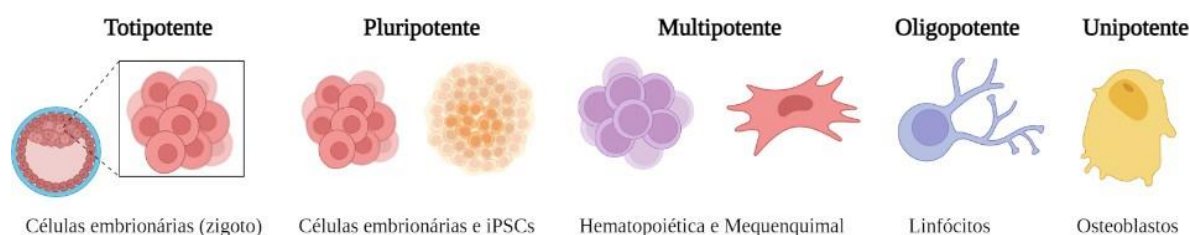


Figura 1: Capacidade de diferenciação de células-tronco. Imagem feita utilizando os recursos disponíveis no Biorender.com

O uso de células-tronco é uma abordagem promissora para reparar danos teciduais, pois essas células secretam moléculas sinalizadoras chamadas fatores de crescimento que influenciam vários processos, como cicatrização de feridas, proliferação, diferenciação e migração celular (MIZUNO et al., 2012; KORIA, 2012). A linhagem MC3T3-E1 é uma célula-tronco unipotente derivada da calvária de camundongos recém-nascidos comprometidos com uma linhagem específica de osteoblastos (YAZID, et al., 2010; GIBON, et al., 2012).

Os osteoblastos são células de origem mesenquimal, sendo as mais importantes no processo de osteogênese. Alguns estudos mostraram que os osteoblastos podem afetar a homeostase do corpo porque a proteína osteocalcina pode atuar como um hormônio que atinge o pâncreas, os testículos e o tecido adiposo (LIU, et al., 2019).

A utilização de células indiferenciadas, como as de origem mesenquimal, estão sendo muito utilizadas associadas a nanomateriais na medicina regenerativa.

2. NANOTECNOLOGIA

A pesquisa e o desenvolvimento da nanotecnologia é um dos maiores marcos científicos do século XIX. Kumar e colaboradores 2020 definiram a nanotecnologia como "um campo multidisciplinar no qual as propriedades e estruturas dos materiais são manipuladas em escala nanométrica por meio de vias físicas, químicas e biológicas" (KUMAR, et al., 2020).

Os nanomateriais variam em tamanho entre 1 a 100 nanômetros e podem ser sintetizados em várias formas, como nanotubos, nanopartículas, nanofibras, nanocarreadores, nanoesferas, entre outros (SENGUL, et al., 2020). Pesquisas mostram que alguns materiais em escalas nanométricas possuem propriedades diferentes quando comparados à escala normal, sendo essas propriedades importantes para a área científica (YADAV, et al., 2022).

As nanopartículas apresentam diversas vantagens na medicina devido ao seu tamanho nanométrico e propriedades físico-químicas, podendo também ser preparadas de diferentes formas e métodos químicos. As nanopartículas podem ser classificadas como metálicas, pois podem ser sintetizadas com metais como prata, ouro, zinco e dióxido de titânio, que são amplamente utilizadas em aplicações biomédicas (ABDAL DAYEM, et al., 2018).

Uma das principais vantagens da nanotecnologia é o desenvolvimento de terapias específicas, além de sua presença em diversas áreas médicas, como diagnóstico precoce, *drug delivery*, biologia molecular, biotecnologia, tratamento de câncer, imunoterapia e engenharia de tecidos (MAHAI, et al., 2019; KUMAR, et al., 2020). As nanopartículas podem interagir com outras biomoléculas devido às propriedades de superfície, como porosidade, estabilização e heterogeneidade, resultando em melhor biodistribuição no corpo humano (MAHAI, et al., 2019).

As nanopartículas (NPs) podem ser utilizadas para regeneração tecidual e fechamento de feridas (internas) ou como *drug delivery* para agentes terapêuticos. Já foi demonstrado que nanopartículas metálicas, como ouro, prata e dióxido de titânio possuem propriedades antibacterianas essenciais para o fechamento de feridas (MAHAI, et al., 2019; AKAKURU, et al., 2020). Após as lesões, os microrganismos podem infectar a área, dificultar o processo de cicatrização e formar biofilmes que causam resistência aos antibióticos, o que representa um grande risco para os pacientes (PORMOHAMMAD, et al., 2021).

O dióxido de titânio (TiO_2) tem sido objeto de grandes descobertas nos últimos anos, pois a redução de seu tamanho à escala nanométrica e a alteração de sua forma levam a propriedades químicas e físicas únicas. As nanopartículas de TiO_2 possuem uma grande área de superfície à medida que o tamanho desses materiais diminui e a correlação entre superfície e volume pode criar propriedades físico-químicas melhores do que em escalas normais. (ALONSO-GOULART, et al., 2021).

O TiO_2 é um dos metais mais importantes e é usado em diversos produtos como pigmentos para tintas, cosméticos, protetores solares, preservação de alimentos, painéis solares, implantes biomédicos além de serem utilizados em regeneração óssea. Ao ser utilizado, é importante garantir a estabilidade das fases cristalinas do TiO_2 , pois as propriedades do material modificado em tamanhos pequenos podem ser afetadas por fatores externos, como temperatura e pressão, podendo alterar as fases cristalinas do dióxido de titânio (CHO, et al., 2013; ZHANG, et al., 2014; HAUGEN, et al., 2016).

Anatase, rutila e brookita são fases cristalinas desta nanopartícula que possuem oito faces poliédricas conectadas, resultando em compartilhamento de faces entre elas. O sistema cristalino da anatase e rutila é tetragonal, enquanto a brookita é ortorrômbica (ZHANG, et al., 2014). Estudos mostram que as fases brookita e anatase geralmente se transformam na fase rutila em um determinado tamanho de partícula, onde a fase rutila atinge maior estabilidade em relação à fase anatase em tamanhos de partícula acima de 14 nm (AKAKURU, et al., 2020).

Em termos de disponibilidade ambiental, rutila é a fase mais simples, enquanto anatase e brookita são raras. (YU, et al., 2017; STEPHEN, 2020). Devido à baixa densidade a fase anatase é considerada a fase mais tóxica entre elas, podendo transitar facilmente para a fase rutila em altas temperaturas ou por outros fatores, como concentração de impurezas e tamanho da partícula (AKAKURU, et al., 2020).

Estudos relatam que as diferentes formas e tamanhos do cristal dessas nanopartículas podem causar toxicidade celular e tecidual e se acumular em órgãos como pulmão, fígado, rins, podem também afetar o sistema neurológico, além de gerar quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo induzir citotoxicidade e genotoxicidade (YU, et al., 2017). Estudos apontam que as NPs de TiO_2 também podem estar associadas a processos como apoptose em células hepáticas humanas (YOO, et al., 2012).

Apesar da controvérsia sobre a possível citotoxicidade e apoptose ao usar NPs de TiO_2 , estudos mostram que tais NPs podem ter um efeito promissor no processo de cicatrização de feridas, pois essas NPs possuem propriedades antimicrobianas muito importantes no processo de cicatrização prevenindo infecções (NIKPASAND, et al., 2019). O efeito antibactericida do TiO_2 pode ser explicado, pois ao gerar espécies reativas de oxigênio, há uma interação com o DNA e enzimas inibitórias causando a morte das bactérias (BLANCO-FERNANDEZ, et al., 2021). Logo espera-se que os NCs de TiO_2 em combinação com as células pré-osteoblásticas possam criar condições favoráveis para o processo de reparo tecidual.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdal Dayem, A., Lee, S., & Cho, S.-G. **The Impact of Metallic Nanoparticles on Stem Cell Proliferation and Differentiation.** *Nanomaterials*. (2018); 8(10), 761. <https://doi.org/10.3390/nano8100761>

Akakuru, O. U., Iqbal, Z. M., & Wu, A. **TiO₂ Nanoparticles: Properties and Applications.** In A. Wu & W. Ren (Eds.) Wiley. *TiO₂ Nanoparticles*. (2020); (1st ed., pp. 1–66).

Alonso-Goulart, V., Carvalho, L. N., Marinho, A. L. G., de Oliveira Souza, B. L., de Aquino Pinto Palis, G., Lage, H. G. D., de Lima, I. L., Guimarães, L. D., Peres, L. C., Silveira, M. M., Lopes, G. H. N. L., Ferreira, L. B., & de Souza Castro-Filice, L. **Biomaterials and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine: A Systematic Review.** *Materials*. (2021); 14(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/ma14164641>

Blanco-Fernandez, B., Castaño, O., Mateos-Timoneda, M. Á., Engel, E., & Pérez-Amodio, S. **Nanotechnology Approaches in Chronic Wound Healing.** *Advances in Wound Care*. (2021); 10(5), 234–256. <https://doi.org/10.1089/wound.2019.1094>

Bui, V. K. H., Park, D., & Lee, Y.-C. (2017). **Chitosan Combined with ZnO, TiO₂ and Ag Nanoparticles for Antimicrobial Wound Healing Applications: A Mini Review of the Research Trends.** *Polymers*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/polym9010021>

Cho, W.-S., Kang, B.-C., Lee, J. K., Jeong, J., Che, J.-H., & Seok, S. H. **Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration.** *Particle and Fibre Toxicology*. (2013); 10(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-9>

Falzarano, M. S., & Ferlini, A. **Urinary Stem Cells as Tools to Study Genetic Disease: Overview of the Literature.** *Journal of Clinical Medicine*. (2019); 8(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/jcm8050627>

Gibon, E., Batke, B., Jawad, M. U., Fritton, K., Rao, A., Yao, Z., Biswal, S., Gambhir, S. S., & Goodman, S. B. **MC3T3-E1 osteoprogenitor cells systemically migrate to a bone defect and enhance bone healing.** *Tissue Engineering. Part A*. (2012); 18(9–10), 968–973. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0545>

Gonzalez, A. C. de O., Costa, T. F., Andrade, Z. de A., & Medrado, A. R. A. P. **Wound healing—A literature review.** *Anais Brasileiros de Dermatologia*. (2016); 91, 614–620. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>

Guillamat-Prats, R. **The Role of MSC in Wound Healing, Scarring and Regeneration.** *Cells.* (2021); 10(7), 1729. <https://doi.org/10.3390/cells10071729>

Haugen, H. J., & Lyngstadaas, S. P.. **21—Antibacterial effects of titanium dioxide in wounds.** In M. S. Ågren (Ed.). Woodhead Publishing. *Wound Healing Biomaterials.* (2016); (pp. 439–450).

Koria, P. **Delivery of Growth Factors for Tissue Regeneration and Wound Healing.** *BioDrugs.* (2012); 26(3), 163–175. <https://doi.org/10.2165/11631850-0000000000-000000>

Kumar, S., Nehra, M., Kedia, D., Dilbaghi, N., Tankeshwar, K., & Kim, K.-H. **Nanotechnology-based biomaterials for orthopaedic applications: Recent advances and future prospects.** *Materials Science and Engineering: C.* (2020); 106, 110154. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110154>

Liu, H., Yang, M., Wu, G., Yang, L., Cao, Y., Liu, C., Tan, Z., Jin, Y., Guo, J., & Zhu, L. **Effects of different oxygen concentrations on the proliferation, survival, migration, and osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells.** *Connective Tissue Research.* (2019); 60(3), 240–253. <https://doi.org/10.1080/03008207.2018.1487413>

Mihai, M. M., Dima, M. B., Dima, B., & Holban, A. M. **Nanomaterials for Wound Healing and Infection Control.** *Materials.* (2019); 12(13), 2176. <https://doi.org/10.3390/ma12132176>

Mizuno, H., Tobita, M., & Uysal, A. C. **Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine.** *Stem Cells.* (2012); 30(5), 804–810. <https://doi.org/10.1002/stem.1076>

Negut, I., Dorcioman, G., & Grumezescu, V. **Scaffolds for Wound Healing Applications.** *Polymers.* (2020); 12(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/polym12092010>

Nikpasand, A., & Parvizi, M. R. **Evaluation of the Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles/Gelatin Composite on Infected Skin Wound Healing; An Animal Model Study.** *Bulletin of Emergency and Trauma,* (2019); 7(4), 366–372. <https://doi.org/10.29252/beat-070405>

Pormohammad, A., Monych, N. K., Ghosh, S., Turner, D. L., & Turner, R. J. **Nanomaterials in Wound Healing and Infection Control.** *Antibiotics.* (2021); 10(5), 473. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050473>

Rajabzadeh, N., Fathi, E., & Farahzadi, R. **Stem cell-based regenerative medicine.** *Stem Cell Investigation.* (2019); 6, 19. <https://doi.org/10.21037/sci.2019.06.04>

Sampogna, G., Guraya, S. Y., & Forgione, A. **Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine.** *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. . (2015); 3(3), 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2015.05.002>

Sengul, A. B., & Asmatulu, E. **Toxicity of metal and metal oxide nanoparticles: A review.** *Environmental Chemistry Letters*. (2020); 18(5), 1659–1683. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01033-6>

Stephen, L. **Assorted Dimensional Reconfigurable Materials.** *IntechOpen*. (2020); 140p. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92056>

Yadav R, Dubey A, Tiwari SP, Shrivastava P, Mandal S. **Nanotechnology and its Applications: A Scientific Boon for Future.** *International Journal of Drug Delivery Technology*. (2022); 12(1):454-461. <https://doi.org/10.25258/ijddt.12.1.80>

Yazid, M. D., Ariffin, S. H. Z., Senafi, S., Razak, M. A., & Wahab, R. M. A. **Determination of the differentiation capacities of murines' primary mononucleated cells and MC3T3-E1 cells.** *Cancer Cell International*. (2010); 10(1), 42. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-10-42>

Yoo, K.-C., Yoon, C.-H., Kwon, D., Hyun, K.-H., Woo, S. J., Kim, R.-K., Lim, E.-J., Suh, Y., Kim, M.-J., Yoon, T. H., & Lee, S.-J. **Titanium dioxide induces apoptotic cell death through reactive oxygen species-mediated Fas upregulation and Bax activation.** *International Journal of Nanomedicine*. (2012); 7, 1203–1214. <https://doi.org/10.2147/IJN.S28647>

Yu, Q., Wang, H., Peng, Q., Li, Y., Liu, Z., & Li, M. **Different toxicity of anatase and rutile TiO₂ nanoparticles on macrophages: Involvement of difference in affinity to proteins and phospholipids.** *Journal of Hazardous Materials*. (2017); 335, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.04.026>

Zhang, H., & Banfield, J. F. **Structural Characteristics and Mechanical and Thermodynamic Properties of Nanocrystalline TiO₂.** *Chemical Reviews*. (2014); 114(19), 9613–9644. <https://doi.org/10.1021/cr500072j>

CAPÍTULO II

RESUMO

A medicina regenerativa é um dos campos mais importantes do século XIX, juntamente com o desenvolvimento de biomateriais em nanoescala. A combinação de células e nanomateriais pode trazer benefícios, como a regeneração tecidual. O dióxido de titânio é um metal bem estudado com inúmeras aplicações devido às suas propriedades únicas em comparação com outros metais. Neste estudo, nanocristais de dióxido de titânio foram sintetizados e caracterizados nas fases anatase, rutila e brookita. Ensaio de viabilidade, proliferação e migração foram realizados em células MC3T3-E1 usando nanocristais de TiO_2 em diferentes concentrações. Os resultados mostraram que os nanocristais são de alta pureza e exibem diferentes fases em função do tratamento térmico de 650°C e 800°C. As diferentes fases e concentrações dos nanocristais não exibiram citotoxicidade para as células e aumentaram a proliferação celular com destaque a RA 100 que aumentou a migração celular em comparação com o controle.

Palavras-chaves: Medicina regenerativa; dióxido de titânio; migração; citotoxicidade; proliferação.

ABSTRACT

Regenerative medicine is one of the most important fields of the 19th century, along with the development of nanoscale biomaterials. The combination of cells and nanomaterials can bring benefits such as tissue regeneration. Titanium dioxide is a well-studied metal with numerous applications due to its unique properties compared to other metals. In this study, titanium dioxide nanocrystals were synthesized and characterized in anatase, rutile, and brookite phases. Viability, proliferation, and migration assays were performed on MC3T3-E1 cells using TiO₂ nanocrystals in different concentrations. The results show that the nanocrystals are of high purity and have different phases depending on the thermal treatment at 650 °C and 800 °C. The different phases and concentrations of nanocrystals did not exhibit cytotoxicity for cells and increased cell proliferation, with emphasis on RA 100, which increased cell migration compared to the control.

Keywords: Regenerative medicine; titanium dioxide; migration; cytotoxicity; proliferation.

1. INTRODUÇÃO

A medicina regenerativa visa reparar, regenerar e substituir órgãos e tecidos danificados por meio da combinação de células, biomateriais e a biologia molecular e para ser bem-sucedida deve funcionar ou estimular a regeneração do tecido original [1].

A perda de tecido, falência de órgãos e deformidades congênitas, são tratadas há anos com transplante de órgãos/tecidos, uso de aloenxertos, dispositivos sintéticos, mas essas terapias têm limitações como falta de doadores, rejeição imunológica, reações alérgicas e procedimentos cirúrgicos complicados [2, 3]. Por exemplo, de acordo com dados da UNOS (United Network for Organ Sharing), foram realizados 42,800 transplantes nos Estados Unidos no ano de 2022, porém, apenas 6,466 pessoas vivas se tornaram doadores no mesmo ano, portanto a falta de órgãos/doadores é preocupante [4].

A medicina regenerativa pode auxiliar nessas limitações, pois utiliza diversos tipos celulares como fibroblastos, células tronco, queratinócitos que secretam moléculas sinalizadoras influenciando em vários processos, como cicatrização de feridas, proliferação, diferenciação e migração celular [2, 3]. As células utilizadas podem ser do próprio paciente (autólogas), de outro indivíduo (alogenicas) ou em alguns casos, células de animais (xenogênicas) [5].

O estudo da medicina regenerativa utilizando a recursos da nanotecnologia é um dos marcos científicos mais importantes do século XIX [6]. As nanopartículas de TiO_2 possuem uma grande área de superfície à medida que o tamanho desses materiais diminui e a correlação entre superfície e volume pode criar propriedades físico-químicas melhores do que em escalas normais [7].

As nanopartículas variam em tamanho entre 1 a 100 nanômetros e podem ser utilizadas para regeneração tecidual no fechamento de feridas (internas) utilizando nanopartículas metálicas ou não metálicas, ou como *drug delivery* para agentes terapêuticos. Já foi demonstrado que nanopartículas metálicas, como ouro, prata e dióxido de titânio possuem propriedades antibacterianas essenciais para a cicatrização de feridas [8,9].

O dióxido de titânio (TiO_2) é um dos metais mais importantes e é usado em diversos produtos como pigmentos para tintas, cosméticos, protetores solares, preservação de alimentos, painéis solares e implantes biomédicos. Ao ser utilizado, é importante garantir a estabilidade das fases cristalinas do TiO_2 , pois as propriedades e a reatividade química do material modificado em tamanhos pequenos são afetadas por fatores externos, como temperatura e pressão, que podem alterar as fases cristalinas do dióxido de titânio conhecidas como: anatase, rutila e brookita [10, 11].

Anatase, rutila e brukita são fases cristalinas do TiO_2 que possuem oito faces poliédricas conectadas, resultando em compartilhamento de faces entre elas. O sistema cristalino da anatase e rutila é tetragonal, enquanto a brukita é ortorrômbica [10]. A anatase é o tipo mais comum e a rutila é a forma mais estável, enquanto a brukita é a mais rara [12].

Estudos relatam que as diferentes formas e tamanhos do cristal dessas nanopartículas podem causar toxicidade celular e tecidual e se acumular em órgãos como pulmão, fígado, rins, podem também afetar o sistema neurológico, além de gerar quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo induzir citotoxicidade e genotoxicidade e apoptose [13].

Apesar da controvérsia sobre a possível citotoxicidade e apoptose ao usar NPs de TiO_2 , estudos mostram que tais NPs podem ter um efeito promissor no processo de cicatrização de feridas, pois possuem propriedades antimicrobianas muito importantes no processo de cicatrização prevenindo infecções [14].

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* se os nanocristais (NCs) de dióxido de titânio nas fases rutila/anatase e rutila/brukita em diferentes concentrações podem causar efeitos citotóxicos e interferir no processo de proliferação e migração celular.

2. METODOLOGIA

2.1. Síntese e caracterização dos NCs de TiO_2

Todos os nanocristais 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 300mL de água ultrapura e 60mL de ácido nítrico (HNO_3 , 70%, Sigma Aldrich), sob agitação magnética durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 60mL de isopropóxido de titânio ($\text{Ti}(\text{OCH}(\text{CH}_3)_2)_4$, 97%, Sigma-Aldrich). O pH da solução foi ajustado para 5.6 utilizando uma solução 4M de hidróxido de sódio (NaOH 98%, Sigma-Aldrich) e adicionou-se a 400mL 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 por 10 minutos. Finalmente, o precipitado foi purificado e submetido ao seguinte recozimento sucessivo térmico na atmosfera ambiente: 650°C/1h (amostra RA – rutila e anatase) e 800°C/1h (amostra RB – rutila e brukita).

A difração de raios X (XRD) foi registrada com um DRX-6000 (Shimadzu, Shenzhen, China) utilizando radiação monocromática Cu-K α 1 ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) para confirmar a formação de NCs de TiO₂ bem como a estrutura do cristal, tamanho e fração de massa média de cada fase. O tamanho dos NCs foi estimado com base na equação de Debye-Scherrer (Guinier, A. Difração de raios X em cristais, cristais imperfeitos e corpos amorfos. W.H. Freeman: San Francisco, 1963) com 32 (rutila) e 44,1 nm (rutila) para recozimento térmico a 650°C/1 h e 800°C/1 h, respectivamente. Os padrões de DRX das amostras tratadas a 650°C/1 h e 800°C/1 h utilizou o pico (110) da fase rutilo localizado em aproximadamente $2\theta = 27,8^\circ$. A porcentagem das fases anatase, rutila e brookita foram calculadas com base em relatos em outros lugares [15, 16]. Os espectros Raman foram registrados com um LabRAM HR Evolution Spectrometer (Horiba) usando um laser de 633 nm. Todas as caracterizações foram realizadas à temperatura ambiente.

2.2. Cultivo Celular

As células utilizadas em todos os ensaios foram as MC3T3-E1 subclone 4 obtidas pela American Type Culture Collection (ATCC), EUA. Após o descongelamento, as células foram cultivadas em garrafas de 75cm², utilizando o meio de cultura α -MEM (Gibco™, Life Technologies, CA, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, São Paulo, Brasil) e Antibiótico-Antimicótico 1X (Gibco™, Life Technologies, CA, EUA). O meio de cultura foi trocado 2-3 vezes por semana até que as células atingissem aproximadamente 80% de confluência. Foram utilizadas células na passagem 7-9 em todos os ensaios.

2.3. Dispersão dos NCs de TiO₂

A dispersão dos NCs foi preparada utilizando uma solução estoque de NCs das fases RA e RB em água ultrapura a uma concentração de 10 mg/mL. 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 10 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 RA e RB em meio de cultura de células foi realizado por diluição da solução estoque em α -MEM suplementado com SFB a 10% (v/v), pH 7 nas concentrações de 50 μ g/mL e 100 μ g/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 α -MEM com SFB a 10% [17].

2.4. Viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado pelo teste de alamar blue, onde aproximadamente 1×10^4 das células MC3T3-E1 foram adicionadas em uma placa de 96 poços, com meio α -MEM suplementado com 10% de SFB. As placas foram incubadas *overnight* a 37°C em atmosfera úmida com 5% CO₂ para que as células pudessem aderir. Após esse tempo, os NCs RA e RB foram adicionados como dose única por 24 horas nas concentrações 50µg/mL e 100µg/mL. Como controle, as células foram cultivadas em meio α -MEM 10% de SFB. Foi utilizado 0,3µM de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) em PBS 1X filtrada. A placa foi incubada por 4 horas protegida da luz, e em seguida a absorbância foi medida em uma leitora de placa (EnSpire® Multimode Plate Reader - Massachusetts, EUA) a 570 nm. O teste de viabilidade celular foi realizado 24 horas após o tratamento. Resultados foram calculados utilizando a equação abaixo:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Absorbância\ tratamento - branco}{média\ do\ controle} \times 100$$

2.5. Proliferação Celular

Para o ensaio de proliferação celular, inicialmente 5×10^4 de células MC3T3-E1 foram adicionadas em uma placa de 12 poços e incubadas *overnight* a 37°C em atmosfera úmida com 5% CO₂ e meio de cultura α -MEM contendo 10% SFB. Em seguida, foi retirado o meio de cultura e adicionados os NCs RA e RB como dose única por 24 horas nas concentrações 50µg/mL e 100µg/mL. Posteriormente, no dia 0 (após o tratamento de 24 horas) o meio de cultura foi retirado, e as células foram gentilmente lavadas com PBS 1X, e em seguida incubadas com 500µL de 0.25% tripsina/EDTA por 5 minutos a 37°C em atmosfera úmida com 5% CO₂ e centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm. O *pellet* foi ressuspensionado com meio α -MEM, 10% SFB. Em seguida foram contadas utilizando o corante azul de tripan na câmara de Neubauer. Esse processo foi repetido nos dias 2 e 4 após o tratamento

2.6. Migração celular

A migração celular foi realizada utilizando insertos de 0.9 mm de espessura (CytoSelect™, Cell Biolabs, San Diego, CA, EUA) e foram adicionadas 1×10^5 células MC3T3-E1 em cada poço de uma placa de 24 poços, com meio de cultura α -MEM contendo 10% SFB e incubadas *overnight* a 37°C em atmosfera úmida com 5% CO₂. Em seguida os insertos e meio de cultura foram retirados dos poços da placa, e adicionado o tratamento com os NCs de TiO₂, nas fases RA e RB e concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL. Nos poços de controle foi adicionado somente meio α -MEM e 10% SFB. Os tratamentos permaneceram na placa durante os tempos de 0, 8, 24, 30 e 48 horas para a obtenção das imagens no aumento de 10x utilizando o microscópio EVOS (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). As imagens foram analisadas com o plugin *Wound_healing_size_tool* no *software* ImageJ.

2.7. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo *software* GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA). Para as comparações de médias do ensaio de viabilidade celular foi utilizado a ANOVA-One-Way e para os ensaios de proliferação e migração celular foi utilizado a ANOVA-Two-Way ($P < 0.05$). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Síntese e caracterização dos NCs de TiO₂

A Figura 1 mostra os padrões XRD das amostras que foram submetidas às temperaturas e tempos de 650°C/1h e 800 °C/1h. Os padrões das características da difração TiO₂ em rutila (JCPDS: 1: 21-1276) e fase de brukita (JCPDS: 29-1360) foram representados pelos símbolos (**) e (***), respectivamente. A temperatura de 650°C mostra a transformação da anatase para rutila, e com o aumento da temperatura para 800°C/1h, observou-se que em torno de 16% da fração dos nanocristais eram de brukita.

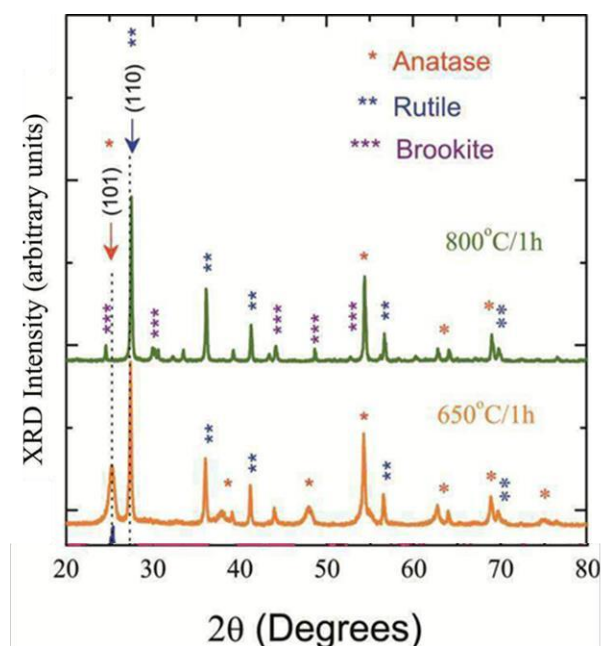


Figura 1: Padrões XRD das amostras sujeitas a técnicas de recozimento 650°C/1h e 800°C/1h.

Após a síntese dos NCs e sua caracterização utilizando análise XRD, os NCs obtidos foram RA contendo as fases do TiO₂ Rutila/Anatase com tamanho de 32nm e o RB contendo as fases Rutila/Brukita de 44.1nm, como mostra a tabela abaixo.

Nome	Temperatura	Tamanho	Composição
Rutila/Anatase (RA)	650°C	32 nm	35.44% anatase e 64.56% rutila
Rutila/Brukita (RB)	800°C	44.1 nm	84.07% rutila e 15.93% brukita

Tabela 1: Nanocristais RA e RB, temperatura utilizada para síntese, tamanho dos NCs e sua composição das fases anatase, rutila e brukita do TiO₂.

A Figura 2 mostra os espectros de micro-Raman de NCs de TiO₂ sujeitos a aquecimento térmico de 650°C / 1h e 800°C / 1h. Todos os espectros foram normalizados até o pico de maior intensidade, de modo a facilitar a visualização dos modos ativos micro-Raman.

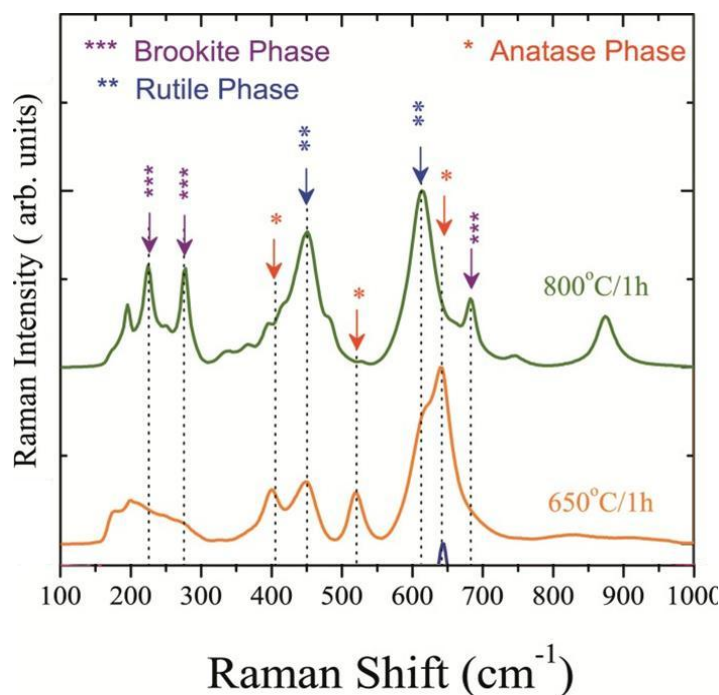


Figura 2: - Espectro Micro Raman de NCs de TiO₂ sujeitos a 650°C / 1h e 800°C / 1h.

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. Com o aumento da temperatura térmica para 650°C / 1h ocorreu a transformação da fase de anatase em rutila e há algumas modificações no espectro de NCs de TiO₂. Essas mudanças estão relacionadas à transformação de anatase em fase de brukita, em excelente concordância com os resultados XRD (Figura 1). Nos espectros dos NCs de TiO₂ sob a temperatura de 800 °C/ 1h existem modos de vibração da fase de brukita. Esses resultados confirmam a presença de fase de brukita, 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 TiO₂ são de alta pureza e exibem diferentes fases em função do tratamento térmico.

3.2. Viabilidade celular

Determinar a viabilidade celular é um dos parâmetros mais importantes ao testar um novo biomaterial para garantir a ausência de citotoxicidade. Parte da controvérsia em torno do TiO₂ é a diferença nos resultados em relação à citotoxicidade. Segundo a pesquisa de Pamela Santos-Aguilar e colaboradores (2023), os nanocristais de TiO₂ de diferentes formas e tamanhos podem causar toxicidade celular e tecidual e se acumular em órgãos como pulmões, fígado, rins, além de afetar o sistema neurológico [13, 18].

A viabilidade celular foi analisada após uma única dose de 24 horas de NCs de TiO₂ nas fases RA e RB em duas concentrações de 50 µg/ml e 100 µg/ml. O teste realizado foi o

Alamar Blue (AB), um teste metabólico que utiliza o indicador redox fluorimétrico resazurina, um composto azul não fluorescente que pelo processo de respiração aeróbica em células viáveis, será reduzido de forma irreversível a resofurina alterando a coloração para rosa, podendo ser medido tanto a absorbância quanto fluorescência [19].

A figura 3 mostra que o uso de RA e RB nas concentrações de 50 e 100µg/mL nas células durante 24 horas não apresentou citotoxicidade, já que conforme a ISO10993:5(2009), somente amostras que apresentem redução abaixo de 70% de viabilidade são consideradas citotóxicas.

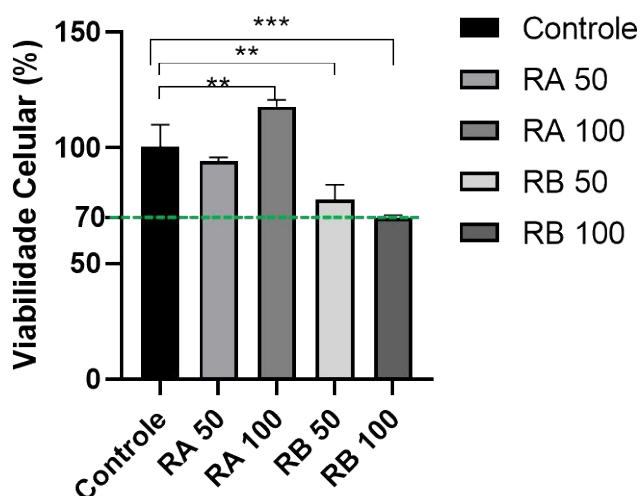


Figura 3: Viabilidade celular por alamar blue após 24 horas de tratamento com NCs nas fases RA e RB nas concentrações 50µg/mL e 100µg/mL. As análises estatísticas foram avaliadas pelo método ANOVA-One-Way (** p= 0.001; *** p = 0.0001).

Estudos como o de Zhang Y e colaboradores (2011) relataram que a viabilidade da linhagem MC3T3 diminuiu quando os nanocristais de TiO₂ de diferentes tamanhos foram testados nas concentrações 50µg/mL e 100µg/mL após 24 horas de tratamento [20]. O trabalho de Zhang usou nanocristais de anatase de diferentes tamanhos com pureza de 99%, enquanto este trabalho usou nanocristais de rutila/anatase e rutila/brookita, como mostra a tabela 1. Essa diferença de resultados pode ser explicada pelo fato da anatase ser mais tóxica devido a sua baixa densidade, enquanto a fase rutila apresenta maior estabilidade entre as três fases principais [9].

Apesar das formas cristalinas dos NCs de TiO₂ podem ser um fator essencial ao se estudar citotoxicidade, acredita-se que a toxicidade dos NCs de TiO₂ também podem estar relacionado ao seu tamanho, forma, revestimento da superfície, irradiação UV e exposição à luz [21]. Por exemplo, Dar et al 2020 relataram que estudos realizados com NCs menor que

20 nm podem causar citotoxicidade, genotoxicidade, além de afetar o sistema imune [22] o que está de acordo com nossos resultados, pois os NCs utilizados tinham 32 e 44.1nm de tamanho e não apresentaram citotoxicidade.

De acordo com a metodologia de Ribeiro 2016, a preparação de NCs pode ter um impacto significativo nos resultados de viabilidade, pois visa alcançar melhor estabilidade e homogeneidade ao dispersar NCs em meio de cultura contendo BSA. Duarte 2020 obteve resultados semelhantes de não citotoxicidade em células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano com NCs RA e RB nas mesmas concentrações ao preparar os NCs com a mesma metodologia, indicando que a metodologia é eficaz [18, 23].

3.3. Proliferação e migração celular

A Figura 4 mostra os resultados do teste de proliferação celular nos dias 2 e 4 após 24 h de tratamento com os NCs RA e RB. No segundo dia, a proliferação celular aumentou significativamente quando comparado o controle com RA 100µg/mL, RB 50µg/mL e RB 100µg/mL. No 4º dia, a proliferação celular quase triplicou em relação ao segundo dia, e apresentou diferença significativa entre o grupo controle para todos os tratamentos incluindo RA 50 µg/mL, que não tinha apresentado diferença estatística no segundo dia.

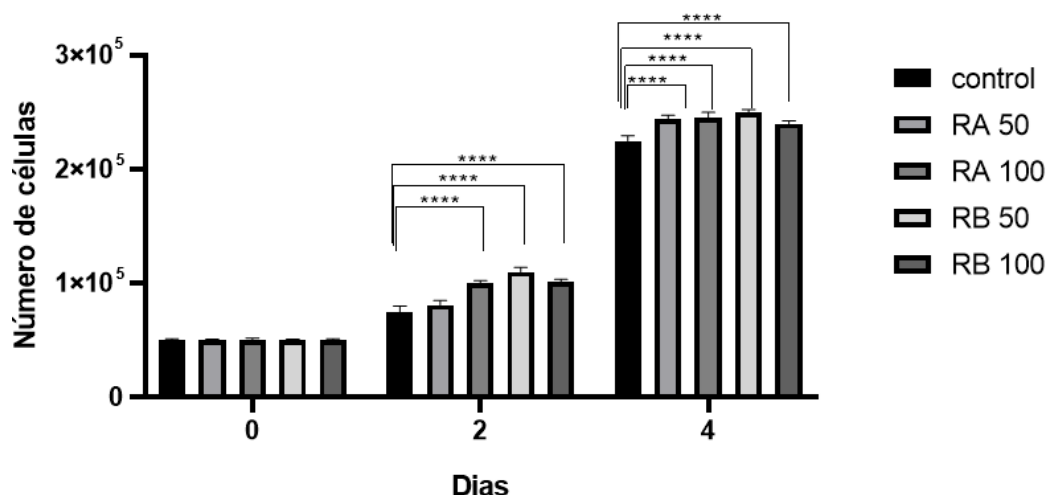


Figura 4: Efeito dos NCs de TiO₂ RA e RB nas concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL após 2 e 4 dias na proliferação da MC3T3-E1. Diferença significativa entre controle e tratamentos (P < 0.0001)

O processo de cicatrização de feridas envolve fatores complexos, como hemostasia que dá início à resposta inflamatória, o recrutamento de células e citocinas, a proliferação celular e por fim, a remodelação. A proliferação celular desempenha um papel fundamental, pois os tecidos de granulação são formados nesta fase, que contribuem para a contração das

extremidades. No local da lesão, são liberados mediadores químicos que sinalizam células inflamatórias, que têm a capacidade de migrar em direção ao tecido lesionado e fechar a ferida, restaurando a integridade do tecido [24, 25].

A análise da porcentagem de fechamento da ferida no ensaio de migração celular revelou que com 24 horas de tratamento, houve fechamento da ferida em torno de 60% para as células tratadas com RA 50µg/mL e RB 100µg/mL, enquanto RA 100µg/mL o fechamento foi em torno de 75% apresentando uma maior migração estatisticamente significativa quando comparado com o controle. Houve também uma diferença significativa entre os tratamentos como RA 100µg/mL com RB 50µg/mL e RA 100µg/mL, onde RA 100µg/mL também apresentou uma maior migração celular, como mostra a figura 5A.

Com 30 horas de tratamento, o RA 100µg/mL apresentou uma porcentagem de migração em torno de 80%, continuando com uma diferença significativa no fechamento da ferida, sendo maior que o controle e que o RB 50 e 100µg/mL. Observa-se ainda, que RA 50µg/mL apresentou maior migração que RB 50µg/mL, como mostra a figura 5B.

A figura 5C mostra que, com 48 horas, o fechamento das feridas com todos os tratamentos dos NCs e controle é de 100%, não apresentando mais diferenças e significativas.

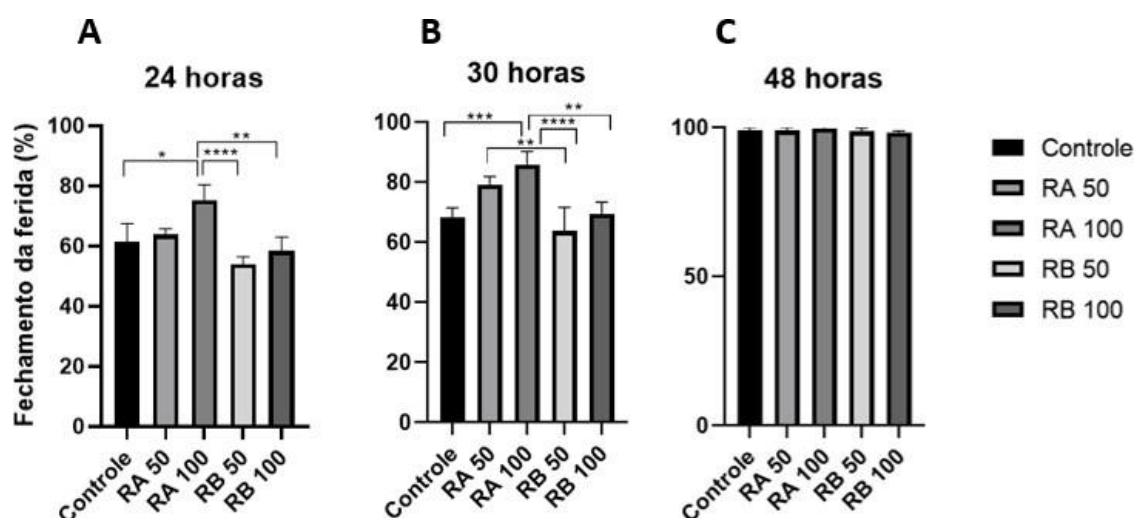


Figura 5: Migração celular utilizando NCs de TiO₂ RA e RB nas concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL nos tempos 24 horas (A), 30 horas (B) e 48 (C). Diferença significativa entre controle e RA 100µg/mL e entre tratamentos. (*p = 0.01; **p = 0.001; ***p = 0.001; ****p < 0.0001).

Observa-se que os resultados do tratamento RB 50µg/mL foram baixos quando comparados com os outros tratamentos. Na migração celular, esse tratamento teve o menor desempenho no fechamento da ferida com menos de 60%, tanto em 24 horas, quanto com 30 horas que fica em cerca de 60%, enquanto outros tratamentos são cerca de 70% (figura 6A).

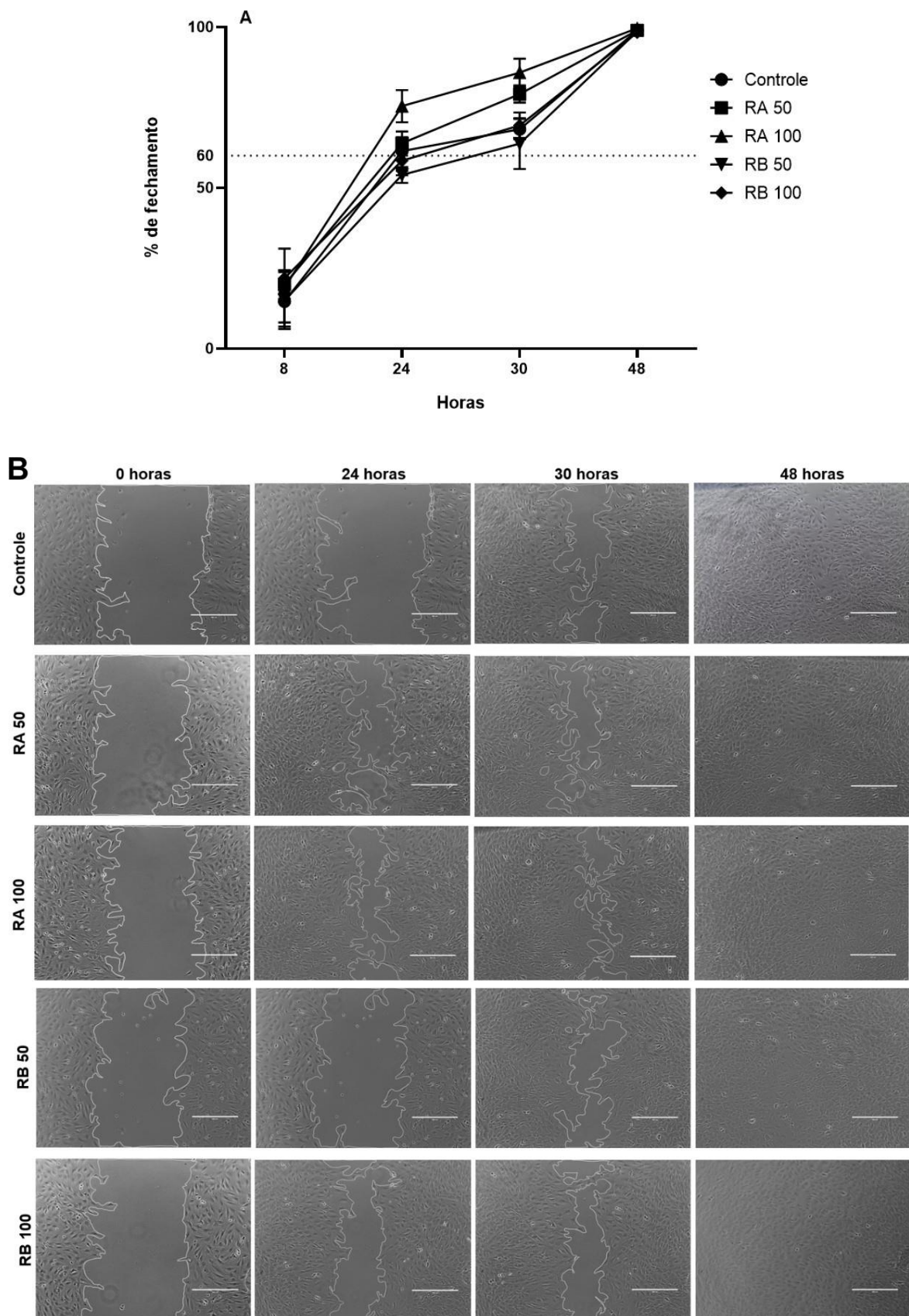


Figura 6: Curva de migração celular dos tratamentos de NCs nos tempos 0, 8, 24, 30 e 48 horas (A). Imagens do ensaio de wound healing mostrando a migração das células MC3T3 tratadas com NCs de TiO_2 RA e RB nas

concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL nos tempos 0, 24 , 30 e 48 horas no aumento de 10X (400µm) do microscópio Evos (B).

Os resultados de proliferação e migração celular obtidos neste estudo são semelhantes aos de Babitha S e colaborador (2017), pois mostram que o uso de nanopartículas de TiO₂ tetragonais menores que 100nm associadas à *scaffolds* de polidopamina-zeína aumentam tanto a proliferação quanto migração celular *in vitro* de queratinócitos, quando comparados com controle ou *scaffolds* sem o TiO₂. Além disso, também mostraram que o TiO₂ teve forte influência na regeneração epidérmica, pois reduziu as feridas em ratos em 15 dias em comparação ao grupo controle [26].

4. CONCLUSÃO

Os NCs de TiO₂ nas fases RA e RB em concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL não apresentaram efeito citotóxico e auxiliaram na proliferação durante 4 dias das células MC3T3. Além disso, o NC Rutila/Anatase na concentração de 100µg/mL aumentou a migração das células MC3T3 nos testes *in vitro*. Como as células MC3T3-E1 são pré-osteoblastos, ensaios como indução de diferenciação osteogênica e análise da expressão gênica são essenciais para uma possível regeneração óssea associada aos nanocristais de TiO₂.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. Sampogna, G.; Guraya, S. Y.; Forgione, A. Regenerative Medicine: Historical Roots and Potential Strategies in Modern Medicine. *Journal of Microscopy and Ultrastructure* **2015**, 3 (3), 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2015.05.002>.
2. Koria, P. Delivery of Growth Factors for Tissue Regeneration and Wound Healing. *BioDrugs* **2012**, 26 (3), 163–175. <https://doi.org/10.2165/11631850-000000000-00000>.
3. Mizuno, H.; Tobita, M.; Uysal, A. C. Concise Review: Adipose-Derived Stem Cells as a Novel Tool for Future Regenerative Medicine. *Stem Cells* **2012**, 30 (5), 804–810. <https://doi.org/10.1002/stem.1076>.
4. cindy young. 2022 organ transplants again set annual records. UNOS. <https://unos.org/news/2022-organ-transplants-again-set-annual-records/> (accessed 2023-05-22).

5. Dzobo, K.; Thomford, N. E.; Senthebane, D. A.; Shipanga, H.; Rowe, A.; Dandara, C.; Pillay, M.; Motaung, K. S. C. M. Advances in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: Innovation and Transformation of Medicine. *Stem Cells Int* **2018**, 2018, 2495848. <https://doi.org/10.1155/2018/2495848>.
6. Yadav R, Dubey A, Tiwari SP, Shrivastava P, Mandal S. Nanotechnology and its Applications: A Scientific Boon for Future. *International Journal of Drug Delivery Technology*. **2022**;12(1):454-461.
7. Alonso-Goulart, V.; Carvalho, L. N.; Marinho, A. L. G.; de Oliveira Souza, B. L.; de Aquino Pinto Palis, G.; Lage, H. G. D.; de Lima, I. L.; Guimarães, L. D.; Peres, L. C.; Silveira, M. M.; Lopes, G. H. N. L.; Ferreira, L. B.; de Souza Castro-Filice, L. Biomaterials and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine: A Systematic Review. *Materials* **2021**, 14 (16), 4641. <https://doi.org/10.3390/ma14164641>.
8. Mihai, M. M.; Dima, M. B.; Dima, B.; Holban, A. M. Nanomaterials for Wound Healing and Infection Control. *Materials* **2019**, 12 (13), 2176. <https://doi.org/10.3390/ma12132176>.
9. *TiO₂ Nanoparticles - TiO₂ Nanoparticles - Wiley Online Library*. 2020 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527825431.ch1> (accessed 2023-05-22).
10. Zhang, H.; Banfield, J. F. Structural Characteristics and Mechanical and Thermodynamic Properties of Nanocrystalline TiO₂. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (19), 9613–9644. <https://doi.org/10.1021/cr500072j>.
11. Cho, W.-S.; Kang, B.-C.; Lee, J. K.; Jeong, J.; Che, J.-H.; Seok, S. H. Comparative Absorption, Distribution, and Excretion of Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles after Repeated Oral Administration. *Part Fibre Toxicol* **2013**, 10 (1), 9. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-9>.
12. Rashid, M. M.; Forte Tavčer, P.; Tomšič, B. Influence of Titanium Dioxide Nanoparticles on Human Health and the Environment. *Nanomaterials* **2021**, 11 (9), 2354. <https://doi.org/10.3390/nano11092354>.
13. Yu, Q.; Wang, H.; Peng, Q.; Li, Y.; Liu, Z.; Li, M. Different Toxicity of Anatase and Rutile TiO₂ Nanoparticles on Macrophages: Involvement of Difference in Affinity to Proteins and Phospholipids. *Journal of Hazardous Materials* **2017**, 335, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.04.026>.

14. Nikpasand, A.; Parvizi, M. R. Evaluation of the Effect of Titatnium Dioxide Nanoparticles/Gelatin Composite on Infected Skin Wound Healing; An Animal Model Study. *Bull Emerg Trauma* **2019**, 7 (4), 366–372. <https://doi.org/10.29252/beat-070405>
15. Yu, J.; Yu, J. C.; Leung, M. K.-P.; Ho, W.; Cheng, B.; Zhao, X.; Zhao, J. Effects of Acidic and Basic Hydrolysis Catalysts on the Photocatalytic Activity and Microstructures of Bimodal Mesoporous Titania. *Journal of Catalysis* **2003**, 217 (1), 69–78. [https://doi.org/10.1016/S0021-9517\(03\)00034-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9517(03)00034-4).
16. Koo, B.; Park, J.; Kim, Y.; Choi, S.-H.; Sung, Y.-E.; Hyeon, T. Simultaneous Phase- and Size-Controlled Synthesis of TiO₂ Nanorods via Non-Hydrolytic Sol–Gel Reaction of Syringe Pump Delivered Precursors. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110 (48), 24318–24323. <https://doi.org/10.1021/jp065372u>.
17. Ribeiro, A. R.; Gemini-Piperni, S.; Travassos, R.; Lemgruber, L.; C. Silva, R.; Rossi, A. L.; Farina, M.; Anselme, K.; Shokuhfar, T.; Shahbazian-Yassar, R.; Borojevic, R.; Rocha, L. A.; Werckmann, J.; Granjeiro, J. M. Trojan-Like Internalization of Anatase Titanium Dioxide Nanoparticles by Human Osteoblast Cells. *Sci Rep* **2016**, 6 (1), 23615. <https://doi.org/10.1038/srep23615>.
18. Santos-Aguilar, P.; Bernal-Ramírez, J.; Vázquez-Garza, E.; Vélez-Escamilla, L. Y.; Lozano, O.; García-Rivas, G. D. J.; Contreras-Torres, F. F. Synthesis and Characterization of Rutile TiO₂ Nanoparticles for the Toxicological Effect on the H9c2 Cell Line from Rats. *ACS Omega* **2023**, 8 (21), 19024–19036. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c01771>.
19. Longhin, E. M.; El Yamani, N.; Rundén-Pran, E.; Dusinska, M. The Alamar Blue Assay in the Context of Safety Testing of Nanomaterials. *Frontiers in Toxicology* **2022**, 4.
20. Zhang, Y.; Yu, W.; Jiang, X.; Lv, K.; Sun, S.; Zhang, F. Analysis of the Cytotoxicity of Differentially Sized Titanium Dioxide Nanoparticles in Murine MC3T3-E1 Preosteoblasts. *J Mater Sci: Mater Med* **2011**, 22 (8), 1933–1945. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4375-7>.
21. Prokopiuk, V.; Yefimova, S.; Onishchenko, A.; Kapustnik, V.; Myasoedov, V.; Maksimchuk, P.; Butov, D.; Bespalova, I.; Tkachenko, A. Assessing the Cytotoxicity of TiO₂-x Nanoparticles with a Different Ti³⁺/(Ti²⁺)/Ti⁴⁺ Ratio. *Biol Trace Elem Res* **2023**, 201 (6), 3117–3130. <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03403-3>.

22. *Toxicity of TiO₂ Nanoparticles* - *TiO₂ Nanoparticles* - *Wiley Online Library*.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9783527825431.ch2> (accessed 2023-05-23).
23. 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. dos; 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* **2020**, *13* (18), 4071.
<https://doi.org/10.3390/ma13184071>.
24. Keely, P. J. Cell Migration within Three-Dimensional Matrices. *Encyclopedia of Biological Chemistry* **2013**, 436–445. doi:10.1016/b978-0-12-378630-2.00495-3
25. Landén, N. X.; Li, D.; Stähle, M. Transition from Inflammation to Proliferation: A Critical Step during Wound Healing. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73* (20), 3861–3885.
<https://doi.org/10.1007/s00018-016-2268-0>
26. Babitha, S.; Korrapati, P. S. Biodegradable Zein–Polydopamine Polymeric Scaffold Impregnated with TiO₂ Nanoparticles for Skin Tissue Engineering. *Biomed. Mater.* **2017**, *12* (5), 055008. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa7d5a>.