

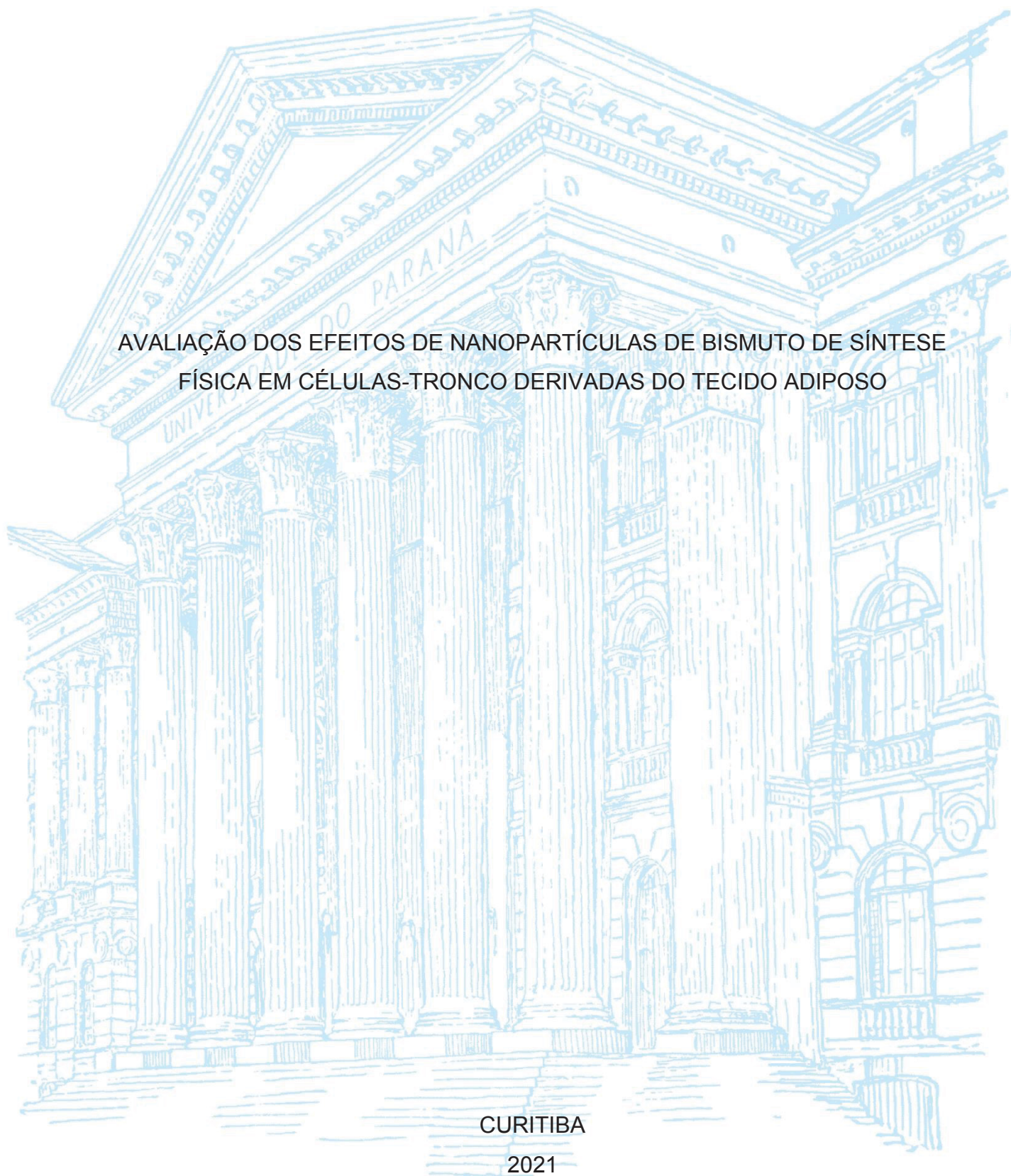
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANNANDA LYRA RIBEIRO

AValiação dos efeitos de nanopartículas de bismuto de síntese física em células-tronco derivadas do tecido adiposo

CURITIBA

2021



ANNANDA LYRA RIBEIRO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO DE SÍNTESE
FÍSICA EM CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Dra. Alessandra Melo de Aguiar

Coorientadora: Dra. Cintia Delai da Silva Horinouchi

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Ribeiro, Annanda Lyra

Avaliação dos efeitos de nanopartículas de bismuto de síntese física em células-tronco derivadas do tecido adiposo. / Annanda Lyra Ribeiro. – Curitiba, 2021.

115 p.: il.

Orientadora: Alessandra Melo de Aguiar.

Coorientadora: Cintia Delai da Silva Horinouchi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Bismuto. 2. Nanopartículas. 3. Células-tronco. 4. Diferenciação celular. 5. Adipogenia. I. Título. II. Aguiar, Alessandra Melo de. III. Horinouchi, Cintia Delai da Silva. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 546.718



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANNANDA LYRA RIBEIRO** intitulada: **Avaliação dos efeitos de nanopartículas de bismuto de síntese física em células-tronco derivadas do tecido adiposo**, sob orientação da Profa. Dra. ALESSANDRA MELO DE AGUIAR, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Agosto de 2021.

Assinatura Eletrônica

01/09/2021 12:26:17.0

ALESSANDRA MELO DE AGUIAR

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

01/09/2021 13:58:56.0

FRANCISCO FILIPAK NETO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

22/09/2021 17:29:41.0

ANDRÉ LUIZ FRANCO SAMPAIO

Avaliador Externo (FARMANGUINHOS)

Rua Cel Francisco H. dos Santos, 100. - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1676 - E-mail: pgbiocel@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 109086

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 109086

Dedico este trabalho à minha querida família e ao meu amado namorado, por serem a fonte de todo amor que eu já recebi.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente aos meus pais, Ana Lyra e Julio Ribeiro, por terem dedicado todo amor do mundo a mim e meus irmãos. Obrigada por estarem sempre presentes na minha vida e por terem me proporcionado, com muitos sacrifícios pessoais e profissionais ao longo do caminho, as oportunidades para chegar até esse momento tão especial.

Agradeço aos meus irmãos, Anna Julia Lyra Ribeiro e Gabriel Lyra Ribeiro, por toda a amizade e parceria ao longo dos anos. Obrigada por compartilharem dos meus sonhos e me incentivarem nos momentos de dificuldade.

Agradeço ao meu amado namorado, Rafael Pereira, o qual acompanhou de perto todas as etapas da minha vida acadêmica ao longo dos últimos 9 anos. Obrigada por sempre me incentivar minhas aventuras e por acreditar sempre no meu potencial. Ter você ao meu lado faz toda a diferença.

O meu maior agradecimento é direcionado as minhas orientadoras, Alessandra Aguiar e Cintia Horinouchi. Obrigada por terem me recebido de braços abertos e por terem compartilhado conselhos que foram muito além do conhecimento científico, permitindo que esse período fosse repleto também de crescimento pessoal. Muitas vezes vocês acreditaram em mim mais do que eu mesma. Aos meus olhos vocês sempre serão exemplos de mulheres e pesquisadoras. Obrigada por tudo!

Agradeço aos pesquisadores Bruno Dallagiovanna, Marco Stimamiglio, Patrícia Shigunov e Alejandro Dominguez por serem excelentes mentores e estarem sempre dispostos a compartilharem suas ideias e sugestões, tornando o LABCET um lugar de trabalho dinâmico e instigante.

Agradeço ao LABCET por todos os momentos de trabalho compartilhados com leveza e alegria. Dedico um agradecimento especial à Anny Robert, Ariane Paschoal, Letícia Bassaí, Giuliana Biagini, Hellen Machado e Rubens Gomes pela ajuda com a execução de experimentos ou pelo simples ombro amigo. Agradeço também a María Julia Barisón e a Bruna Marcon pela assessoria científica. À toda equipe do LABCET: Amanda, Ana Paula, Bernardo, Bruno, Crisciele, Evelin, Isabelle, Rhaíza, Rodrigo N., Rodrigo e a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Agradeço aos colaboradores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Arandi Bezerra Junior e Thiago Machado, por fornecerem as nanopartículas que foram

matéria-prima para este trabalho e pela paciência para sanar todas as minhas (várias) dúvidas.

Agradeço à Rede de Plataformas Tecnológicas da FIOCRUZ pelo uso de suas subunidades. Em especial à Plataforma de Microscopia Confocal e Eletrônica do Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ-PR) e as colaboradoras Anny Robert e Bruna Marcon, pelo apoio no desenvolvimento e análise de experimentos de microscopia eletrônica.

Agradeço imensamente aos pesquisadores que compõe a banca por aceitarem prontamente avaliar e revisar este trabalho: Francisco Filipak Neto, André Sampaio e Daniela Leme, muito obrigada!

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação do Instituto Carlos Chagas por me proporcionarem a experiência única de desenvolver este projeto em duas instituições de pesquisa e ensino que são referência no país.

Por fim, agradeço as agências de fomento e fontes financiadoras desse projeto: FIOCRUZ, Fundação Araucária, CNPq, Capes.

“Devemos acreditar que somos talentosos para alguma coisa, e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada.”

Marie Curie

RESUMO

Nanopartículas de bismuto (BiNPs) são nanomateriais de grande interesse biomédico, sendo investigadas principalmente no desenvolvimento de biossensores, terapias para o tratamento de câncer e no diagnóstico por imagem. Entretanto, pouco se sabe acerca da toxicidade de BiNPs de síntese física em células humanas. Nesse sentido, as células-tronco mesenquimais (CTMs) representam um vantajoso modelo *in vitro* para avaliação da toxicidade de nanopartículas por suas características específicas, como autorrenovação e potencial de diferenciação. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade de BiNPs produzidas por ablação a laser em meio líquido (LASiS) em células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSCs). Após a síntese, as BiNPs foram caracterizadas por espectrometria UV/VIS, espalhamento dinâmico da luz (DLS), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e potencial zeta. Em seguida, o efeito das BiNPs na viabilidade celular relativa de ADSCs foi determinado pelos ensaios de captação do vermelho neutro (VN), MTT e quantificação nuclear com DAPI. A análise da interação entre BiNPs e ADSCs à nível ultraestrutural foi realizada por MET, ao passo que a proliferação celular foi analisada através de imunomarcagem de Ki-67 e incorporação de EdU. A toxicidade mitocondrial de BiNPs foi avaliada através dos parâmetros de massa (MitoTracker® Green FM) e atividade mitocondrial (JC-10). Os efeitos de BiNPs na diferenciação adipogênica e osteogênica foram quantificados após 14 ou 21 dias, respectivamente, através de sistema *high content imaging* Operetta™ e/ou RT-qPCR. A caracterização físico-química confirmou a presença de BiNPs na solução coloidal, que apresenta pico plasmônico entre 250 – 260 nm, morfologia esférica e tamanho heterogêneo, tendo potencial zeta entre $-3,55 \pm 1,28$ e $-8,55 \pm 1,23$ mV. Os ensaios de citotoxicidade demonstraram que as BiNPs reduziram a viabilidade celular de ADSCs somente na concentração mais alta testada (345 µg/ml), sendo que as três técnicas apresentaram perfil citotóxico semelhante. A análise morfológica realizada por MET confirmou que as BiNPs induziram estresse celular somente em elevadas concentrações (302,24 µg/ml), equivalentes ao IC₅₀ do ensaio de MTT. Além disso, a exposição as BiNPs aumentaram a expressão do marcador de proliferação celular Ki-67 e a incorporação do análogo de timina EdU, indicando que as BiNPs podem induzir a proliferação celular. As BiNPs promoveram hiperestimulação mitocondrial através do aumento do potencial de membrana mitocondrial de ADSCs. A adipogênese foi inibida após exposição única ou repetida à BiNPs, conforme observado através da redução na formação de gotículas de gordura e dos níveis de expressão de mRNA de marcadores específicos da via adipogênica como o PPARγ, CEBPA e FABP4. Assim, as BiNPs exercem toxicidade sobre diferentes parâmetros celulares de ADSCs, incluindo a diferenciação celular, reforçando a importância de uma avaliação toxicológica abrangente dos mecanismos de toxicidade e interação celular para estabelecer a segurança dessas nanopartículas.

Palavras-chave: Nanopartículas; Bismuto; Células-tronco; Diferenciação celular; Adipogênese.

ABSTRACT

Bismuth nanoparticles (BiNPs) are nanomaterials of great interest for biomedical applications, being mainly investigated in the development of biosensors, cancer therapy and diagnostic imaging. However, little is known about the toxicity of physically-synthesized BiNPs in human cells. Mesenchymal stem cells (MSCs) represent an advantageous in vitro model for toxicity evaluation of nanoparticles due to their specific cell characteristics, such as self-renewal and differentiation potential. Thus, this study aimed to evaluate the toxicity of BiNPs produced by laser ablation solution (LASiS) in human adipose derived stem cells (ADSCs). BiNPs were characterized by UV/VIS spectroscopy, dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscopy (TEM) and zeta potential. Afterwards, relative cell viability of ADSCs was assessed by neutral red uptake assay (NRU), MTT and quantification of cell number with DAPI after BiNPs exposure. Interaction between BiNPs and ADSCs at the ultrastructural level was investigated through TEM, while cell proliferation was assessed by Ki-67 immunostaining and EdU incorporation. BiNPs mitochondrial toxicity was evaluated on mitochondrial mass (MitoTracker® Green FM) and activity (JC-10). Effects of BiNPs on adipogenic and osteogenic differentiation were quantified after 14 or 21 days, respectively, using high content imaging system Operetta™ and/or RT-qPCR. The physicochemical characterization confirmed the presence of BiNPs in the colloidal solution, which has a plasmon peak around 250 – 260 nm, spherical morphology and heterogenous size, presenting zeta potential values between $-3,55 \pm 1,28$ e $-8,55 \pm 1,23$ mV. Cytotoxicity assays demonstrated that BiNPs reduced ADSCs cell viability at the highest tested concentration (345 µg/ml) and the three techniques used for cell viability assessment exhibited similar toxicity profile for BiNPs. Morphological analysis performed by TEM confirmed that BiNPs induced cellular stress only at concentrations equivalent to the IC₅₀ from MTT assay. Furthermore, exposure to BiNPs increased the expression of the cell proliferation marker Ki-67 and the incorporation of thymine analogue EdU, indicating that BiNPs might induce cell proliferation. BiNPs also promoted mitochondrial hyperstimulation by increasing ADSCs mitochondrial membrane potential. Adipogenesis was inhibited after single or repeated exposure to BiNPs, as observed by reduction of intracellular lipidic droplets and mRNA expression levels of specific biomarkers of adipogenic differentiation, such as PPARγ, CEBPA e FABP4. Thus, BiNPs may promote toxicity on different cellular mechanisms of ADSCs, including cell differentiation, reinforcing the importance of a comprehensive toxicological evaluation of mechanisms of cell toxicity and cell interaction to guarantee a safety application of these nanoparticles.

Keywords: Nanoparticles; Bismuth; Stem cells; Cell differentiation; Adipogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais características das nanopartículas	21
Figura 2: Propriedades físico-químicas de BiNPs responsáveis por sua interação e toxicidade em sistemas biológicos.	28
Figura 3: Principais aplicações biomédicas em investigação para BiNPs.....	30
Figura 4: Representação esquemática da síntese física de BiNPs pela técnica de LASiS	32
Figura 5: Tipos de células-tronco	35
Figura 6: Representação esquemática das estratégias de exposição empregadas para avaliação da viabilidade celular após exposição prolongada as BiNPs	45
Figura 7: Lotes de produção de BiNPs desconsiderados para ensaios biológicos após caracterização físico-química	55
Figura 8: Caracterização físico-química de BiNPs produzidas por LASiS.....	57
Figura 9: Avaliação da citotoxicidade de BiNPs em ADSCs	58
Figura 10: Análise ultraestrutural da interação entre ADSCs e BiNPs	60
Figura 11: Avaliação da toxicidade mitocondrial de BiNPs pelo corante lipofílico catiônico JC-10.....	61
Figura 12: Imagem representativa de ADSCs marcadas com MitoTracker® Orange CMTMRos após o tratamento com BiNPs.....	62
Figura 13: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial pelo corante MitoTracker® Orange CMTMRos.....	63
Figura 14: Imagem representativa de ADSCs marcadas com MitoTracker® Green FM após o tratamento com BiNPs.....	64
Figura 15: Determinação da massa mitocondrial pelo corante MitoTracker® Green FM.....	64
Figura 16: Imagem representativa da imunomarcagem da proteína nuclear Ki-67 ...	65
Figura 17: Efeito de BiNPs sobre a proliferação celular de acordo com a imunomarcagem da proteína nuclear Ki-67.....	66
Figura 18: Imagem representativa das células positivas para marcação com EdU..	67
Figura 19: Avaliação da proliferação celular através do ensaio de incorporação do EdU	67
Figura 20: Influência da exposição prolongada a BiNPs (14 dias) sobre a viabilidade celular relativa de ADSCs.....	68

Figura 22: Imagem representativa de ADSCs não induzidas e induzidas à diferenciação adipogênica durante 14 dias.	69
Figura 23: Análise visual dos efeitos da exposição única à BiNPs na diferenciação adipogênica de ADSCs.	70
Figura 24: Quantificação da eficiência de diferenciação adipogênica após exposição única à BiNPs.....	70
Figura 25: Efeito inibitório da exposição repetida à BiNPs sobre a diferenciação adipogênica de ADSCs.	71
Figura 26: Exposição repetida as BiNPs interferem com a diferenciação adipogênica de ADSCs.....	72
Figura 27: Expressão relativa de genes marcadores da diferenciação adipogênica após exposição única as BiNPs	73
Figura 28: Efeitos da exposição repetida à BiNPs sobre a expressão relativa de genes marcadores da diferenciação adipogênica	73
Figura 29: Efeito de BiNPs sobre a viabilidade de ADSCs após 21 dias em cultura.....	74
Figura 30: Imagem representativa de ADSCs não induzidas e induzidas a diferenciação osteogênica durante 21 dias.	75
Figura 31: Efeito da exposição única de BiNPs sobre a diferenciação osteogênica de ADSCs.	76
Figura 32: Quantificação da eficiência de diferenciação osteogênica de ADSCs após exposição única a BiNPs.....	76
Figura 33: Efeitos da exposição repetida à BiNPs sobre a diferenciação osteogênica de BiNPs.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências dos primers empregados nos experimentos de RT-qPCR. As sequências <i>forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) de cada primer foram listadas.....	53
Tabela 2: Comparação entre os valores de IC ₅₀ obtidos durante os ensaios de viabilidade celular relativa para as três metodologias empregadas.	59

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ADSCs	- Células-tronco derivadas do tecido adiposo
AMP cíclico	- Adenosina 3,5-monofosfato cíclico
ATP	- Adenosina trifosfato
BiNPs	- Nanopartículas de bismuto
BSA	- Albumina sérica bovina
C/EBP α	- <i>CCAAT/enhancer binding protein alpha</i>
C/EBP β	- <i>CCAAT/enhancer binding protein beta</i>
CCCP	- Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona
cDNA	- DNA complementar
COVID-19	- Coronavírus
CPI	- <i>Nanotechnology Consumer Product Inventory</i>
Cq	- Ciclo de amplificação
CREB	- Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico
CTMs	- Células-tronco mesenquimais
DAPI	- 4',6'-diamino-2-fenil-indol
DLS	- <i>Dynamic light scattering</i> (espalhamento dinâmico da luz)
DMEM	- Meio Dulbecco MEM
DMSO	- Dimetilsufóxido
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
D-PBS	- Solução fosfatada sem cálcio e magnésio
EM	- Emissão
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
EX	- Excitação
FABP4	- <i>Fatty acid binding protein 4</i>
IBMX	- Isobutilmetilxantina
IC ₅₀	- Concentração média inibitória
ICP-OES	- Espectroscopia de massa com plasma acoplado indutivamente
IMF	- Intensidade média de fluorescência
ISO	- Organização Internacional de Normalização
LASiS	- Ablação a laser em meio líquido
MET	- Microscopia eletrônica de transmissão
mRNA	- RNA mensageiro

MTT	- <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NMs	- Nanomateriais
NPs	- Nanopartículas
PBS	- Solução salina fosfatada
PFA	- Paraformaldeído
PPAR γ	- <i>Peroxisome proliferator activated receptor gamma</i>
RNA	- Ácido ribonucleico
RT-qPCR	- Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa
RUNX2	- <i>Runt-related transcription factor 2</i>
SFB	- Soro fetal bovino
UTFPR	- Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV/VIS	- Espectroscopia ultravioleta visível
VN	- Vermelho neutro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	- percentual
®	- marca registrada
<	- menor
±	- mais ou menos
≥	- maior igual
µg/ml	- micrograma por mililitro
µl	- microlitro
µm	- micrômetro
µM	- micromolar
µm ²	- micrômetro quadrado
cm	- centímetros
CO ₂	- dióxido de carbono
DP	- desvio padrão
KHz	- quilohertz
M	- molar ou mol/l
ml	- mililitro
mM	- milimolar
nm	- nanômetro
° C	- graus celsius
p	- significância
rpm	- rotação por minuto
™	- marca comercial
U/ml	- unidades por mililitro
W	- watts
x g	- multiplicação pela aceleração gravitacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 O ADVENTO DA NANOTECNOLOGIA.....	19
1.2 NANOPARTÍCULAS E SUAS APLICAÇÕES.....	21
1.3 NANOPARTÍCULAS NA SAÚDE	23
1.4 NANOTOXICOLOGIA	25
1.5 NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO	28
1.5.1 Síntese física de nanopartículas de bismuto	31
1.5.2 Efeitos de nanopartículas de bismuto em células de mamíferos.....	32
1.6 CÉLULAS-TRONCO	34
1.6.1 Células-tronco adultas: as células-tronco mesenquimais.....	35
1.7 CÉLULAS-TRONCO COMO MODELO PARA ENSAIOS DE TOXICIDADE	37
2 OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVO GERAL	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3 METODOLOGIA	40
3.1 DROGAS E REAGENTES	40
3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE BINPS.....	40
3.3 CULTIVO CELULAR	42
3.4 PREPARAÇÃO DE BINPS PARA ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	42
3.5 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR RELATIVA.....	42
3.5.1 Ensaio de viabilidade celular relativa após exposição prolongada a BiNPs	44
3.6 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA INTERAÇÃO ENTRE BINPS E ADSCS ...	45
3.7 ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DO EFEITO DE BINPS SOBRE A FUNÇÃO E ESTRUTURA MITOCONDRIAL	46
3.7.1 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	46
3.7.2 Determinação da massa mitocondrial com MitoTracker® Green FM	47
3.8 ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	48
3.9 ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	49
3.9.1 Diferenciação adipogênica	49
3.9.2 Diferenciação osteogênica	50
3.10 ANÁLISE DOS MARCADORES MOLECULARES DA DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA	51

3.10.1 Extração de RNA.....	51
3.10.2 Síntese de cDNA.....	52
3.10.3 Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa (RT-qPCR).....	52
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
4 RESULTADOS.....	55
4.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO COLOIDAL DE BINPS.....	55
4.2 CITOTOXICIDADE DA SOLUÇÃO COLOIDAL DE BINPS EM ADSCS.....	57
4.3 EFEITOS ULTRAESTRUTURAIS DA INTERAÇÃO ENTRE A SOLUÇÃO COLOIDAL DE BINPS E ADSCS.....	59
4.4 TOXICIDADE MITOCONDRIAL DA SOLUÇÃO COLOIDAL DE BINPS EM ADSCS.....	60
4.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SOLUÇÃO COLOIDAL DE BINPS SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR DE ADSCS.....	65
4.6 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SOLUÇÃO DA COLOIDAL DE BINPS SOBRE A DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA DE ADSCS.....	67
4.7 EFEITOS DA SOLUÇÃO COLOIDAL DE BINPS SOBRE A DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE ADSCS.....	74
5 DISCUSSÃO.....	78
6 CONCLUSÃO.....	88
7 PERSPECTIVAS.....	89
8 REFERÊNCIAS.....	90
APÊNDICE 1 – DESCRIÇÃO COMPLETA DO SETUP EMPREGADO PARA AS SÍNTESES DE BINPS E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	108
APÊNDICE 2 – ARTIGO PUBLICADO.....	109
ANEXO 1 – LAUDO DO POTENCIAL ZETA DE BINPS.....	110

1 INTRODUÇÃO

1.1 O ADVENTO DA NANOTECNOLOGIA

Desde os primórdios da humanidade, partículas em escala nanométrica encontram-se presentes de forma natural no ambiente como resultado de processos biológicos, como o metabolismo de microrganismos, ou de processos antropológicos não-intencionais, como a queima de combustíveis fósseis. A manipulação intencional da matéria em escala atômica, no entanto, só se tornou possível no último quarto de século com o advento da nanotecnologia (BAYDA et al., 2020; JEEVANANDAM et al., 2018). O conceito de nanotecnologia foi introduzido por Richard Feynman no final da década de 50, quando o físico teórico levantou a possibilidade de manipulação dos átomos durante uma de suas palestras (SCHULZ, 2018). Quinze anos após a fala de Feynman, o cientista Nório Taniguchi foi o primeiro a utilizar o termo nanotecnologia para descrever o processo de fabricação, manipulação e caracterização de materiais em escala atômica – os chamados nanomateriais (NMs) ou nanopartículas (NPs) (CONTADO, 2015; HULLA; SAHU; HAYES, 2015).

Até o momento, não existe uma definição universalmente aceita para NMs ou NPs, de forma que ambos os termos são usualmente empregados como sinônimo. Fundamentalmente, NMs são descritos como materiais contendo pelo menos uma de suas dimensões com tamanho entre 1 e 1000 nanômetros (nm) (JEEVANANDAM et al., 2018). Já as NPs, por definição da Organização Internacional de Normalização (ISO), são estruturas cujo tamanho em uma, duas ou três dimensões encontram-se na faixa de 1 a 100 nm (SUKHANOVA et al., 2018). Mais importante do que a definição em si, é o fato de que NPs exibem propriedades físicas, químicas e biológicas únicas em comparação aos seus respectivos materiais de origem em escala não particulada, tais como aumento da superfície de contato, alta reatividade e elevada atividade catalítica (EALIAS; SARAVANAKUMAR, 2017). Dessa forma, as NPs podem ser divididas em diversas categorias de acordo com sua composição, morfologia e funcionalizações de superfície específicas (KHAN *et al.*, 2019).

Quanto a composição, as NPs são comumente divididas em três classes de acordo com o elemento químico do material de origem: orgânicas, inorgânicas e à base de carbono. Como o próprio nome diz, as NPs orgânicas são derivadas de compostos orgânicos e, por essa razão, consideradas altamente biodegradáveis. Os

exemplos mais famosos de NPs inseridas nessa classe são os dendrímeros, os lipossomos e as micelas (FANG et al., 2020). Já as NPs inorgânicas são compostas majoritariamente por metais, sendo subdividas em NPs inorgânicas à base de metais, como NPs de bismuto, ouro e prata; e NPs inorgânicas à base de óxidos metálicos, tais como NPs de dióxido de titânio, óxido de ferro e dióxido de sílica (SAJID; PŁOTKA-WASYLKA, 2020). As NPs à base de carbono contêm carbono como principal elemento da partícula, sendo os nanotubos de carbono e os fulerenos exemplos de NPs inseridas nessa categoria (KHAN; SAEED; KHAN, 2019).

Grande parte das propriedades físico-químicas das NPs são resultantes da morfologia das partículas, de maneira que o formato de cada NP é selecionado de acordo com a finalidade desejada para o material. Com isso, as NPs podem assumir as mais variadas morfologias, indo desde esferas e hastes até cubos e elipses (FAVI et al., 2015). Além de possuírem uma carga de superfície específica, as NPs podem ser projetadas com funcionalizações de superfície específicas para a aplicação almejada, visando o aumento da estabilidade e biodisponibilidade de tais materiais. As funcionalizações de superfície são especialmente importantes no caso de NPs destinadas a aplicações biológicas e podem envolver o revestimento de NPs com proteínas biocompatíveis, a adição de grupos funcionais para estabilização em fluidos biológicos e inserção de ligantes com afinidade a estruturas biológicas (CHOU; MING; CHAN *et al.*, 2011; SAEI et al., 2017).

Em virtude de suas características singulares (Fig. 1), as NPs vem sendo aplicadas em diversos campos da ciência, da medicina e da tecnologia. De fato, algumas das NPs mais promissoras foram capazes de romper as barreiras da pesquisa científica e ganharam espaço no mercado, sendo incorporadas em uma ampla gama de produtos destinados ao uso humano disponíveis atualmente, embora a investigação acerca dos potenciais impactos de NPs em sistemas biológicos e ao meio ambiente ainda esteja em andamento (ZIELIŃSKA et al., 2020). Dessa forma, o surgimento da nanotecnologia provocou um impacto profundo na economia e na sociedade moderna, permitindo o desenvolvimento e a inovação de inúmeras áreas de estudo a partir da nanociência (BHUSHAN & WINKELMANN, 2016).

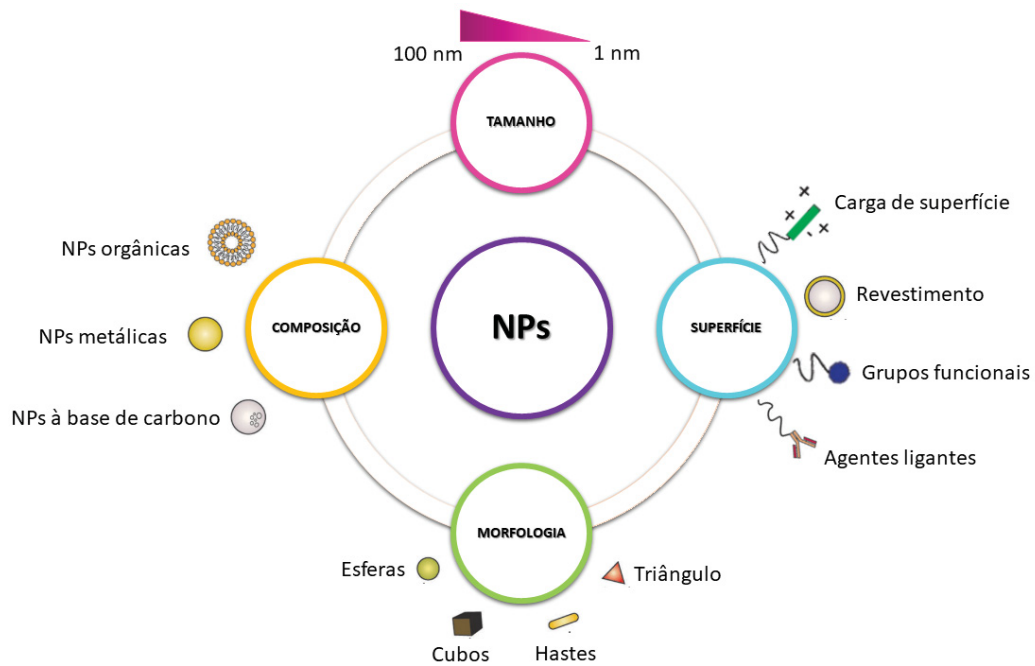


Figura 1: Principais características das nanopartículas. As NPs são nanomateriais com tamanho entre 1 – 100 nm, podendo ser sintetizadas a partir de uma variedade de compostos e em formatos diversos. Além disso, a funcionalização da superfície das NPs confere propriedades físico-químicas específicas que permitem o aumento da estabilidade e da superfície de contato desses materiais. Fonte: Adaptado de (CHOU; MING; CHAN, 2011).

1.2 NANOPARTÍCULAS E SUAS APLICAÇÕES

A nanotecnologia é uma área de estudo multidisciplinar, de forma que grande parte das NPs desenvolvidas até o momento são resultado da associação de diferentes campos do conhecimento, indo desde a química e a biologia até as engenharias. Conseqüentemente, as características físico-químicas únicas e a possibilidade de manipulação das mesmas de acordo com a aplicação de interesse fazem com que as NPs sejam destaque em diversos segmentos da indústria farmacêutica, cosmética, tecnológica, eletrônica, alimentícia e têxtil (STARK et al., 2015). Atualmente, as NPs podem ser encontradas em diferentes produtos destinados ao uso humano, como protetores solares, maquiagens, medicamentos, roupas e têxteis, artigos esportivos, embalagens alimentícias, baterias automotivas e lâmpadas de LED (FYTIANOS; RAHDAR; KYZAS, 2020; SINGH, 2017). As NPs apresentam também aplicações ambientais, podendo atuar como biossensores para detecção de metais no solo, além de serem excelentes biorremediadores para contaminações terrestres e aquáticas (KHAN; SAEED; KHAN, 2019).

Visando documentar a presença de NPs em produtos de consumo disponíveis atualmente no mercado, diferentes organizações mundiais elaboraram inventários para catalogar cada novo produto contendo NPs desenvolvido e em estágio de comercialização. O primeiro e mais citado inventário diz respeito aos produtos à base de NPs disponíveis em território americano. O “*Nanotechnology Consumer Product Inventory*” (CPI) foi elaborado pelo “*Project on Emerging Nanotechnologies*” em parceria com o governo estadunidense e disponibilizado em 2005 (VANCE *et al.*, 2015). Em contrapartida, o “*The Nanodatabase*” – inventário mapeando os produtos à base de NPs disponíveis no mercado de consumo europeu – foi estabelecido somente em 2012 como parte de uma associação entre a Universidade da Dinamarca e a organização independente “*Danish Consumer Council and Ecological Council*” (THE NANODATABASE, 2021).

O CPI americano, atualizado pela última vez em 2015, listou 1814 produtos contendo NPs, registrados por 622 empresas e com permissão para comercialização em 32 países (MOHAJERANI *et al.*, 2019). De acordo com este inventário, 42% das NPs encontram-se em produtos para a Saúde e Beleza, sendo seguido por 21% na categoria Casa e Jardinagem e 12% na categoria de Automobilismo (VANCE *et al.*, 2015; PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2015). Segundo a base de dados dinamarquesa *The Nanodatabase*, existem 5169 produtos com NPs em circulação na Europa atualmente e, da mesma forma que o CPI, a categoria Saúde e Beleza é a de maior destaque, compreendendo 60% do total de produtos com NPs. É interessante notar que, em pouco menos de uma década, o mercado consumidor europeu para produtos à base de NPs cresceu cerca de 427%, indicando a rápida expansão da nanotecnologia no continente (THE NANODATABASE, 2021).

O crescimento no consumo de produtos contendo NPs exerce impacto direto na economia mundial. Estima-se que somente em 2021 o governo americano tenha investido 1,7 bilhões de dólares em pesquisas voltadas à nanotecnologia, totalizando 31 bilhões de dólares destinados a pesquisa e desenvolvimento de NPs desde 2001 (NATIONAL SCIENCE AND TECHNOLOGY COUNCIL, 2020). No Brasil, os dados referentes ao período de 2000 a 2007 indicam que a iniciativa pública destinou cerca de 160 milhões de reais para fundos de pesquisa em nanotecnologia (PISCOPO *et al.*, 2015), sendo esta considerada uma área tecnológica prioritária para investimento entre os períodos de 2020 e 2023 (GOVERNO DO BRASIL, 2020). Com o alto investimento em nanotecnologia, pode-se esperar que os próximos anos tragam ainda

mais NPs inovadoras, aumentando assim a gama de produtos disponíveis no mercado consumidor (SINGH, 2017).

1.3 NANOPARTÍCULAS NA SAÚDE

Uma das principais tendências dentro da nanotecnologia é o desenvolvimento de NPs voltadas para aplicações na área da saúde (AZHDARZADEH et al., 2015). As NPs conseguem transpor a membrana celular devido ao seu tamanho reduzido, sendo capazes de alterar a farmacocinética, a farmacodinâmica e a biodistribuição de moléculas terapêuticas (PRABHA et al., 2016). Assim, uma variedade de NPs já são empregadas ou estão sendo estudadas para utilização em diferentes áreas da medicina, como no desenvolvimento de drogas antitumorais, implantes cirúrgicos, sistemas inteligentes de distribuição de medicamentos, diagnóstico por imagem, engenharia de tecidos e medicina regenerativa (AKÇAN et al., 2020). Até o momento, 503 estudos clínicos envolvendo NPs com aplicações biológicas estão em andamento no cenário mundial, dos quais 13 se concentram na América Latina, sendo 11 desenvolvidos no Brasil (U.S NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2021).

O emprego de NPs na área biomédica tem potencial para afetar positivamente a abordagem diagnóstica e terapêutica de doenças. O aumento da sensibilidade e durabilidade de moléculas associadas a NPs decorrente das propriedades físico-químicas das NPs é explorado no diagnóstico médico para detecção precoce de doenças e na terapia alvo (PATEL; NANDA, 2015). As nanopartículas contendo bismuto (BiNPs), por exemplo, vêm sendo estudadas devido sua capacidade de aumentar a sensibilidade de células à radiação, o que poderia aumentar a eficácia dos tratamentos radioterápicos para tumores malignos (TORRISI et al., 2018). Outras NPs, como as de ouro, já são ativamente empregadas como biossensores para detecção prematura de biomarcadores de câncer de mama, por exemplo (HAKIMIAN et al., 2018; SAEED et al., 2017). Mais recentemente, algumas NPs começaram a ser avaliadas como agentes antivirais para o tratamento de coronavírus (COVID-19), sendo incorporadas como moléculas carreadoras e adjuvantes no desenvolvimento de vacinas de alta eficiência (ALIMARDANI; ABOLMAALI; TAMADDON, 2021).

As NPs encontram-se presentes também em dispositivos médicos, os quais se referem a qualquer aparelho, instrumento ou artigo destinado ao uso em humanos para diagnóstico e tratamento de doenças ou modificação da anatomia corporal e

processo fisiológico danificado. Alguns exemplos de dispositivos médicos com NPs disponíveis para comercialização no mercado europeu são curativos e cateteres antibacterianos com NPs de prata, cimentos odontológicos para restauração dentária com NPs de dióxido de sílica, cateteres reforçados com nanotubos de carbono para maior sustentação e NPs supermagnéticas para tratamento do câncer (MUSAZZI et al., 2017).

As indústrias farmacêutica e cosmética compõe outro nicho ocupado por NPs, as quais são particularmente úteis no desenvolvimento de cosméticos. Algumas das principais vantagens do uso de NPs na cosmetologia são o aumento da penetração de princípios ativos na pele, formulação de novas colorações para batons e esmaltes, transparência em protetores solares e conferência de efeitos de longa duração para maquiagens e cremes (FYTIANOS; RAHDAR; KYZAS, 2020). Exemplos de NPs incorporadas em cosméticos incluem NPs de prata como agentes bactericidas e antifúngicos, NPs de óxido de titânio e zinco como bloqueadores de raios UV e UVB em protetores solares e lipossomas para aumento da permeabilização cutânea (MUSAZZI et al., 2017).

Entretanto, o sucesso da aplicação de NPs na saúde, na indústria farmacêutica e em tantas outras áreas não deve ofuscar a importância dos estudos acerca dos potenciais efeitos adversos desses NMs. Até o momento não existe um consenso entre os órgãos regulatórios mundiais sobre os parâmetros toxicológicos que devem ser avaliados para estabelecer a segurança e eficácia de NPs (VANCE et al., 2015), de forma que muitos dos produtos voltados para a saúde que se encontram em circulação no mercado não contém informações suficientes sobre o perfil toxicológico das NPs encontradas em sua composição (THE NANODATABASE, 2021). Além das NPs já estabelecidas, aquelas que se encontram em fase de desenvolvimento, como as BiNPs, ainda são pouco estudadas em relação a sua interação com sistemas biológicos, limitando assim a determinação de sua segurança para uso humano e também para o meio ambiente (GEHR, 2018). Com isso, a avaliação toxicológica de NPs, bem como a compreensão dos fatores físico-químicos determinantes para sua influência sobre sistemas biológicos são um passo essencial para a projeção de NPs não-tóxicas, seguras e eficientes (AZHDARZADEH et al., 2015).

1.4 NANOTOXICOLOGIA

As propriedades físicas e químicas das NPs desempenham papel fundamental em sua interação com sistemas biológicos, influenciando diretamente os mecanismos de efeitos tóxicos bem como a absorção, o acúmulo e transporte de NPs no organismo (ATTARILAR et al., 2020). Uma vez dispersas no ambiente, as NPs podem entrar em contato direto com os sistemas biológicos por meio de diferentes rotas de exposição, tais como inalação, ingestão ou exposição dérmica, a partir das quais são reconhecidas e internalizadas, passando a interagir com estruturas celulares de acordo com seu mecanismo de ação (ARMSTEAD; LI, 2016). A possível resposta toxicológica desencadeada por esse processo de reconhecimento e internalização é dependente de fatores como tamanho, morfologia, composição, carga de superfície e reatividade da NPs, podendo diferir completamente do perfil toxicológico da mesma substância em escala convencional (MALAKAR et al., 2021).

Diferentes estudos apontam que o tamanho é um dos fatores predominantes na resposta de toxicidade desencadeada por NPs (RIBEIRO et al., 2017; SUKHANOVA et al., 2018). O tamanho das NPs é comparável ao tamanho de proteínas (2 – 10 nm), diâmetro da hélice de DNA (2 nm) e espessura das membranas celulares (10 nm), o que lhes facilita a entrada nas células e o transporte através de diferentes organelas (SUKHANOVA et al., 2018). No caso de NPs com tamanho reduzido, o aumento da superfície de contato permite que uma fração maior da partícula interaja com o ambiente intracelular, aumentando sua potencial toxicidade em comparação com NPs maiores (RIBEIRO et al., 2017).

Outro fator importante é a morfologia das NPs, a qual influencia diretamente os mecanismos de internalização celular. Sabe-se que NPs esféricas são endocitadas mais rapidamente do que NPs em forma de hastes ou fibras, ao passo que NPs não esféricas exibem mais chances de serem transportadas por capilares. Além disso, o formato das NPs afeta também sua superfície de contato. NPs com formato octogonal, por exemplo, apresentam uma superfície de contato pelo menos 8 vezes maior do que NPs esféricas, exibindo assim maior reatividade e atividade catalítica em sistemas biológicos (GATOO et al., 2014; NAVYA; DAIMA, 2016).

A toxicidade das NPs é igualmente influenciada por sua composição química. Estudos nanotoxicológicos evidenciaram que NPs inorgânicas com o mesmo tamanho e morfologia, mas composição química distintas demonstraram perfis

toxicológicos diferentes (YANG et al., 2009; SUKHANOVA et al., 2018). A toxicidade dependente da composição química está relacionada principalmente a liberação de íons metálicos para o ambiente intracelular. Alguns metais, como a prata e o chumbo, são de fato tóxicos e, portanto, capazes de promover danos celulares em baixas concentrações. Por outro lado, íons metálicos como ferro e zinco são úteis do ponto de vista biológico, mas podem ser prejudiciais quando encontradas em excesso dentro das células (ATTARILAR et al., 2020). A liberação de íons em solução pode ser prevenida através da cobertura do núcleo de NPs metálicas com polímeros orgânicos ou pelo emprego de métodos de síntese que utilizem compostos estabilizadores em seu protocolo (SOENEN et al., 2015).

A carga de superfície também desempenha um papel importante na toxicidade de NPs, definindo parcialmente sua interação com sistemas biológicos. Sendo a membrana plasmática carregada negativamente devido à presença de glicoproteínas, NPs com cargas positivas são internalizadas mais rapidamente do que NPs com carga neutra ou negativa e, portanto, exibem maior toxicidade. Além de penetrarem mais efetivamente através da membrana, NPs com cargas positivas podem ainda interagir com outras moléculas carregadas negativamente, como o DNA, podendo gerar genotoxicidade (SUKHANOVA et al., 2018). Outra característica importante influenciada pela carga de superfície das NPs é a formação da corona proteica. Assim que as NPs entram em contato com fluidos biológicos, as proteínas celulares são imediatamente adsorvidas em sua superfície, formando a corona proteica, que confere identidade biológica as NPs. A carga superficial das NPs pode aumentar ou diminuir a afinidade de ligação das proteínas da corona, o que pode resultar em eventuais variações no destino intracelular das NPs (LIU; TANG; DING, 2020).

O revestimento de superfície formado pela corona proteica é dividido em *hard* corona, que representa a camada interna de proteínas que estão fortemente ligadas a superfície das NPs, enquanto as proteínas presentes na *soft* corona possuem ligação reversível as NPs e permanecem nas camadas mais exteriores da partícula. A corona proteica é altamente dinâmica, sendo considerada única para cada NP, e representa o primeiro nível de interação entre as NPs e as células. Dessa forma, a corona proteica influencia fortemente a internalização, o transporte, o destino e os mecanismos de citotoxicidade de NPs em sistemas biológicos. A superfície das NPs pode ser conjugada de maneira artificial com diferentes grupos de proteínas, lipídios e polímeros logo após a síntese como forma de aumentar não só a estabilidade da

partícula mas também para favorecer a formação da corona proteica, aumentando a biocompatibilidade das NPs com potencial para aplicações biomédicas (ABDELKHALIQ et al., 2018; LIU; TANG; DING, 2020).

Nesse contexto, as propriedades físicas e químicas das NPs, as quais influenciam sua interação com sistemas biológicos e sua toxicidade (Fig. 2), devem ser levadas em consideração durante o desenvolvimento de novas NPs (DONAHUE; ACAR; WILHELM, 2019). Atualmente, diversos métodos analíticos visam a caracterização das propriedades físico-químicas das NPs, dentre os quais pode-se destacar as técnicas de microscopia para avaliação da morfologia e do tamanho de NPs, e técnicas baseadas em espectroscopia para determinação da composição e da carga de superfície de partículas em nanoescala. Apesar da ampla gama de técnicas existentes, a caracterização de NPs é um desafio para a comunidade científica, pois as metodologias disponíveis ainda são pouco precisas para análise físico-química de NPs, tendo sido adaptadas a partir de ferramentas utilizadas para análise de materiais em escala convencional. Conseqüentemente, a caracterização robusta de NPs depende do emprego simultâneo de diferentes técnicas que nem sempre são de fácil acesso ou utilização, de forma que não existe um padrão universal de metodologias indispensáveis para avaliação completa de NPs (MOURDIKOURDIS; PALLARES; THANH, 2018a).

Além disso, a natureza heterogênea das propriedades físico-químicas das NPs e as inúmeras possibilidades de interação com sistemas biológicos dificultam a avaliação nanotoxicológica, tornando os dados acerca dos mecanismos de toxicidade de NPs disponíveis na literatura conflitantes (AZHDARZADEH et al., 2015). A falta de clareza sobre o perfil toxicológico de NPs que já se encontram disponíveis no mercado e daquelas em desenvolvimento, dificulta o estabelecimento de uma regulamentação mundial para avaliação de segurança e comercialização de NPs, que ainda se encontram em fase de elaboração. Assim, torna-se necessário que o desenvolvimento de novas NPs seja acompanhado por uma avaliação toxicológica bem planejada e executada de modo a gerar dados consistentes e relevantes (LAI et al., 2018).

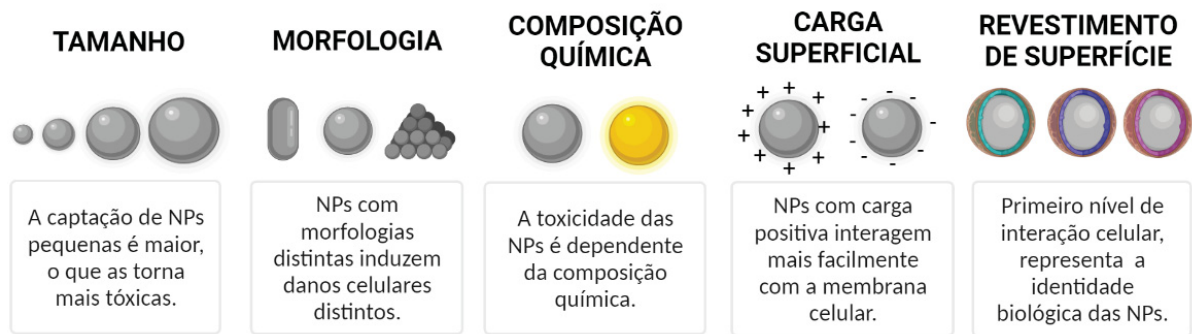


Figura 2: Propriedades físico-químicas de BiNPs responsáveis por sua interação e toxicidade em sistemas biológicos. O esquema foi elaborado a partir do acervo disponível no aplicativo BioRender (<https://biorender.com/>). Fonte: Adaptado de (ATTARILAR et al., 2020).

1.5 NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO

Descrito como um dos metais menos tóxicos e biologicamente reativos da tabela periódica, o bismuto tem sido amplamente utilizado como matéria-prima para a formulação de diferentes produtos médicos e farmacêuticos desenvolvidos ao longo das últimas décadas. Em face das aplicabilidades do bismuto em sua forma bruta, atualmente as nanopartículas de bismuto (BiNPs) são destaque entre as NPs em fase de desenvolvimento devido suas possíveis aplicações biomédicas e suas excelentes propriedades físico-químicas, como boa estabilidade química e atividade catalítica, forte absorvância no infravermelho próximo e alta eficiência de conversão fototérmica. Além disso, as BiNPs são atrativas do ponto de vista econômico, sendo relativamente mais baratas do que NPs compostas por outros metais, como a prata, o que as torna viáveis para produção em larga escala (SHAHBAZI et al., 2020).

Assim como diferentes NPs metálicas, as BiNPs são amplamente investigadas quanto suas propriedades antimicrobianas, que podem ser eventualmente úteis para o tratamento de doenças infecciosas e no combate à resistência bacteriana. Os efeitos inibitórios de BiNPs zerovalentes sobre o crescimento da bactéria *Streptococcus mutans* e formação de biofilme na cavidade oral, por exemplo, foram comparáveis com aqueles descritos para clorexidina, um dos antissépticos orais mais utilizados na odontologia (HERNANDEZ-DELGADILLO et al., 2012, 2017). Já a atividade antimicrobiana de BiNPs de síntese biogênica sobre diferentes cepas da bactéria *Helicobacter pylori* foi superior à observada para sais orgânicos de bismuto, que são tradicionalmente empregados como primeira linha de tratamento para casos de úlceras pépticas e gastrites severas (NAZARI et al., 2014). Além de propriedades

antimicrobianas, as BiNPs apresentam também atividade antifúngica, tendo sido eficazes na inibição do crescimento do fungo *Candida albicans*, principal agente causador da candidíase oral (BADIREDDY et al., 2014).

Devido a boa biocompatibilidade e elevado número atômico do bismuto, o que lhe confere excelente capacidade de retenção de radiação ionizante, as BiNPs são especialmente atrativas como agentes contrastantes para o diagnóstico por imagem (HERNÁNDEZ-RIVERA et al., 2019). Embora outros compostos de bismuto tenham sido estudados na imagiologia, como o sulfeto de bismuto, BiNPs são consideradas uma alternativa promissora por concentrarem uma grande quantidade de íons metálicos em seu núcleo, o que aumenta a absorção de radiação ao mesmo tempo que reduz a dose de administração necessária para o contraste (GOMEZ et al., 2019). Além disso, em comparação com NPs de ouro, as quais são amplamente investigadas como agentes contrastantes, as BiNPs são mais propensas a serem oxidadas em condições fisiológicas, o que diminui a possibilidade de bioacumulação no organismo. BiNPs são igualmente vantajosas do ponto de vista econômico, uma vez que o bismuto custa aproximadamente 2000 vezes menos do que o ouro, além de ser pelo menos 2 vezes mais abundante na atmosfera, o que o torna interessante para uso médico em largas proporções (BROWN; GOFORTH, 2012).

Ainda no contexto da área médica, o emprego de BiNPs para o tratamento de câncer é potencialmente a aplicação mais inovadora e também a mais investigada para essas partículas. Apesar de as terapias tradicionais para o tratamento de câncer estarem em avanço constante, as taxas de mortalidade da doença ainda são altas e os intensos efeitos colaterais dos tratamentos disponíveis permanecem sem solução. Assim, as BiNPs inicialmente chamaram atenção em tratamentos alternativos para o câncer, como a terapia fototérmica, devido a possibilidade de associação com outras terapias convencionais, tais quais a quimioterapia e a imunoterapia (LI et al., 2017; SONG et al., 2019). As BiNPs apresentam ainda boa atividade radiosensibilizadora, aumentando consideravelmente a sensibilidade tumoral à radiação, o que pode potencializar a eficácia do tratamento radioterápico tradicional (DENG et al., 2018; STEWART et al., 2016). Outros estudos buscam ainda combinar as funcionalidades das BiNPs como agentes contrastantes para o diagnóstico por imagem com suas propriedades fototérmicas para criação de um agente teranóstico único capaz de diagnosticar e tratar tumores malignos com maior precisão (LU et al., 2019).

As BiNPs são investigadas também quanto sua aplicação em biossensores para detecção rápida e acurada de eventos biológicos. O bom desempenho de BiNPs nessa área está diretamente relacionado com suas propriedades físicas e biológicas, tais como resistência elétrica, baixa condutividade térmica e habilidade de adsorção de moléculas em sua superfície. Nesse contexto, as BiNPs já foram avaliadas em biossensores para detecção de estresse oxidativo (MUTHUMARIYAPPAN et al., 2019), liberação de peróxido de hidrogênio por células presentes em tumores de mama (MOHAMMADNIAEI et al., 2018) e drogas anti-inflamatórias (NIGOVIĆ; JURIC; MITROVIĆ, 2017).

Em face das inúmeras aplicabilidades sendo estudadas para as BiNPs (Fig. 3), é de se esperar que essas NPs ganhem ainda mais espaço na área biomédica, tendo potencial inclusive para serem incorporadas à produtos de uso humano voltados para a área da saúde. Além do baixo custo para produção em larga escala, as BiNPs são versáteis também em seu processo de síntese, podendo ser produzidas a partir de diferentes metodologias (SHAHBAZI et al., 2020). Entretanto, por ainda estarem em fase de desenvolvimento, pouco se sabe acerca da toxicidade de BiNPs em sistemas biológicos, especialmente em modelos humanos, que são o foco quanto ao eventual uso de BiNPs (ABUDAYYAK et al., 2017). Portanto, uma das etapas cruciais antes da disponibilização de BiNPs para fins biomédicos é a avaliação toxicológica de BiNPs, visando garantir a aplicação segura dessas NPs em sistemas biológicos (REUS et al., 2018).

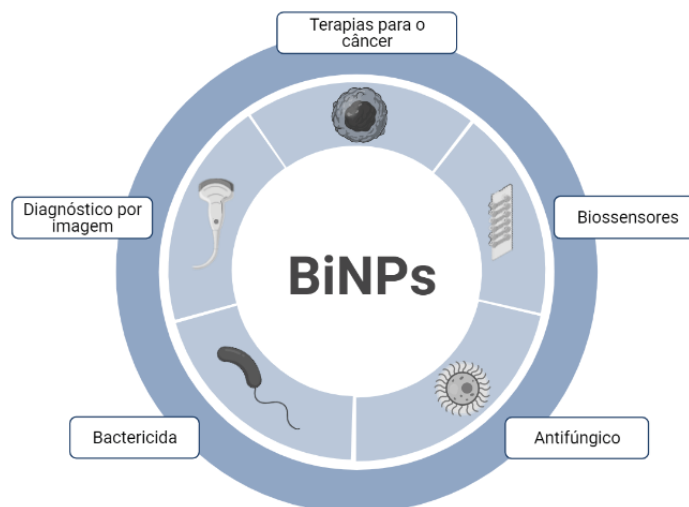


Figura 3: Principais aplicações biomédicas em investigação para BiNPs. Dentre as NPs em desenvolvimento, as BiNPs apresentam uma gama de potenciais aplicações biomédicas que vão desde seu emprego como radiosensibilizadora para terapia do câncer e contrastantes para diagnóstico por

imagem até agentes bactericidas e antifúngicos para tratamento de doenças infecciosas. O esquema foi elaborado a partir do acervo disponível no aplicativo BioRender (<https://biorender.com/>). Fonte: adaptado de (SHAHBAZI et al., 2020).

1.5.1 Síntese física de nanopartículas de bismuto

As técnicas de síntese de NPs estão em constante evolução para suprir as demandas do mercado nanotecnológico e também reduzir os impactos ambientais da produção em larga escala de NPs. De maneira geral, os métodos de síntese de NPs podem ser de forma química, biológica ou física, sendo que cada metodologia apresenta suas vantagens e desvantagens metodológicas (IJAZ et al., 2020).

As técnicas de síntese química são as mais comumente empregadas para a produção de NPs metálicas e baseiam-se na redução de sais do metal de interesse através da utilização de agentes químicos redutores, tais como o citrato de sódio e o ácido ascórbico. Além dos redutores, a síntese química requer também a presença de estabilizadores, como o dodecilsulfato de sódio, para evitar a agregação de NPs metálicas em água ou solventes orgânicos. Embora as NPs de origem química tenham excelente estabilidade e permitam o controle preciso do tamanho e morfologia das partículas, as soluções de NPs recém-sintetizadas podem eventualmente conter subprodutos tóxicos gerados a partir das reações de redução, o que prejudica a pureza das partículas (ELEMIKE et al., 2020).

Buscando superar as limitações da síntese química, recentemente as técnicas de síntese biológica ganharam atenção no ramo da nanobiotecnologia. Considerada uma metodologia *eco-friendly*, a síntese biológica envolve a produção de NPs através do extrato de plantas ou do metabolismo natural de microorganismos. O mecanismo de redução metálica em teoria é o mesmo empregado para a síntese química, com a diferença de que os redutores são agentes biológicos (SPORTELLI et al., 2018). A biossíntese de NPs é um processo escalonável e relativamente barato, mas o longo tempo de preparação da cultura de microorganismos ou plantas e a possibilidade de liberação de toxinas provenientes do metabolismo normal de microorganismos são pontos que devem ser considerados na escolha deste método (ELEMIKE et al., 2020).

Por outro lado, os métodos físicos de produção de NPs, como a ablação a laser em meio líquido (LASiS), apresentam a grande vantagem de não necessitarem do uso de agentes redutores ou estabilizantes e não dependerem do metabolismo biológico para síntese, gerando assim soluções coloidais de NPs livres de subprodutos

indesejados. Na técnica de LASiS, um alvo do metal de interesse, no nosso caso o bismuto, é inserido em meio aquoso e irradiado por um feixe de laser de alta energia, o que resulta na formação de NPs dispersas em solução (Fig. 4). Dessa forma, as características físico-químicas desejadas para as NPs, como a concentração, são alcançadas através da manipulação dos parâmetros de frequência, potência e comprimento de onda do laser (BAIG et al., 2021). Apesar da energia gasta pelo laser limitar a escalabilidade da técnica de LASiS, a síntese física ainda é mais rápida e envolve menos etapas do que os processos de síntese química e biológica, além de gerar NPs com maior pureza (SADROLHOSSEINI et al., 2019), o que é de extrema importância no caso de NPs com possíveis aplicações biomédicas.

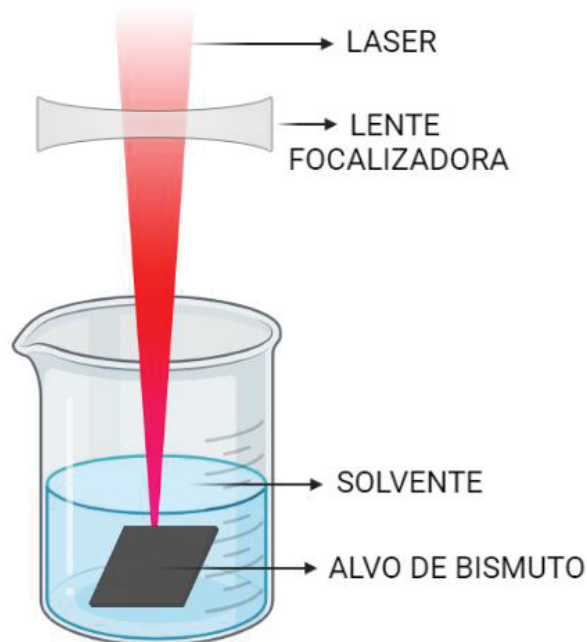


Figura 4: Representação esquemática da síntese física de BiNPs pela técnica de LASiS. Nessa metodologia, um alvo de bismuto metálico de alta pureza é imerso em um solvente (água) e irradiado com um laser de alta energia para geração de BiNPs dispersas em solução. O esquema foi elaborado a partir do acervo disponível no aplicativo BioRender (<https://biorender.com/>). Fonte: adaptado de (SADROLHOSSEINI et al., 2019).

1.5.2 Efeitos de nanopartículas de bismuto em células de mamíferos

Diversos estudos já demonstraram os potenciais efeitos benéficos de BiNPs quando aplicadas na biomedicina, especialmente nas áreas de terapia para o câncer, diagnóstico por imagem, desenvolvimento de biossensores e tratamento de infecções bacterianas e fúngicas (GOMEZ; HALLOT; PORT, 2018). No entanto, uma vez que o

interesse pela aplicabilidade das BiNPs ainda é recente na comunidade científica, estudos acerca de sua toxicidade tem recebido pouca atenção. Até o momento, por exemplo, não existem ensaios clínicos acerca da eficácia e segurança de compostos à base de BiNPs em andamento no cenário mundial (U.S NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2021) e a literatura sobre a citotoxicidade de BiNPs em modelos *in vitro* ainda está em construção e, portanto, é escassa. Com isso, compreender a interação de BiNPs com sistemas biológicos é um passo fundamental para que estas NPs, que são tão visadas na biomedicina, possam futuramente sair das bancadas laboratoriais e serem incorporadas de maneira segura em produtos de uso humano (BADRIGILAN et al., 2020).

Compostos à base de bismuto já foram associados com efeitos adversos *in vivo*, como perda de mobilidade, déficit cognitivo e encefalopatia (BORBINHA et al., 2019; HOGAN; HARBIDGE; DUNCAN, 2018), o que levantou questionamentos sobre a possível toxicidade do bismuto em nanoescala. Em face das limitações dos modelos *in vivo*, como alto custo, longa duração de experimentos e questões éticas, a avaliação *in vitro* é atualmente o principal meio para determinar o comportamento de sistemas biológicos expostos à NPs, especialmente aquelas que se encontram em fase de desenvolvimento (HUSSAIN et al., 2015), como é o caso das BiNPs. Dessa forma, os poucos estudos disponíveis buscaram avaliar majoritariamente a citotoxicidade de BiNPs em modelos *in vitro*, embora células de mamíferos, em especial as humanas, ainda sejam pouco utilizadas (ABUDAYYAK et al., 2017).

Até o momento, NPs de óxido de bismuto de síntese química foram associadas com alterações nos mecanismos de estresse oxidativo por meio da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (AHAMED et al., 2019), morte celular por apoptose e necrose (ABUDAYYAK et al., 2017) e aumento do processo autofágico (LIU et al., 2017) em linhagens celulares humanas. É importante ressaltar que BiNPs de síntese química são as mais produzidas e investigadas quanto a sua toxicidade, ao passo que BiNPs sintetizadas fisicamente foram avaliadas somente em dois estudos, ambos os quais empregaram linhagens celulares murinas como modelo toxicológico e registraram efeitos celulares adversos para este tipo de BiNPs (LUZ et al., 2020; REUS et al., 2018). Além de promoverem a morte celular por apoptose em fibroblastos murinos (REUS et al., 2018), as BiNPs produzidas por LASiS apresentaram também possíveis efeitos tóxicos sobre o sistema imune, o que foi

evidenciado pelo aumento da atividade fagocítica de macrófagos da linhagem RAW 264.7 (LUZ et al., 2020).

Sendo assim, a toxicidade de BiNPs de síntese física ainda não foi explorada em células humanas. Embora os modelos celulares não humanos sejam de grande uso na área da toxicologia, estima-se que eles tenham menor poder preditivo para efeitos tóxicos em humanos (LAUSCHKE et al., 2020). Dessa forma, tendo em vista que as BiNPs são consideradas especialmente para aplicações biomédicas, é imprescindível que BiNPs de síntese física sejam extensamente avaliadas em modelos *in vitro* com alto poder preditivo, como as células-tronco humanas, de forma a fornecer resultados relevantes acerca dos mecanismos pelos quais BiNPs afetam células humanas.

1.6 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco são definidas como uma população de células com potencial de autorrenovação e diferenciação em diferentes tipos celulares (WEISSMAN, 2000). Usualmente, as células-tronco são classificadas de acordo com o tecido de origem e o potencial de diferenciação (Fig. 5). Em relação ao tecido de origem, as células-tronco podem ser derivadas de fontes embrionárias ou adultas. Já em relação ao potencial de diferenciação, podem ser divididas em: totipotentes, as quais têm a habilidade de se diferenciarem em qualquer tipo celular do organismo, incluindo os anexos embrionários; pluripotentes, que podem dar origem a tecidos dos três folhetos embrionários (ectoderme, mesoderme e endoderme), exceto anexos embrionários; e multipotentes, as quais tem capacidade de se diferenciarem em um número limitado de tipos celulares especializados que são geralmente restritos ao folheto de origem (revisado por BACAKOVA et al., 2018). Existem ainda as células-tronco pluripotentes induzidas, que são obtidas de células somáticas e geneticamente reprogramadas para retornarem ao estado de pluripotência (TAKAHASHI et al., 2007).

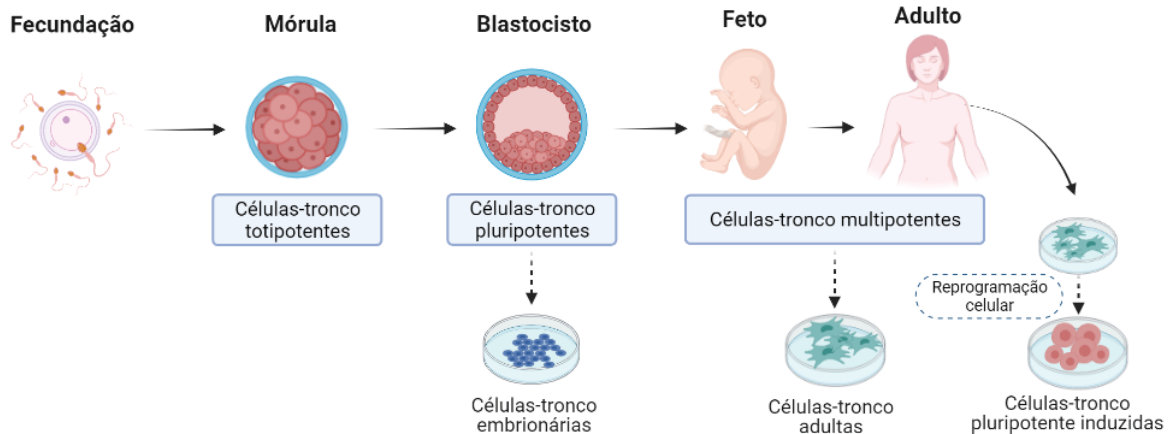


Figura 5: Tipos de células-tronco. Classicamente, as células-tronco são divididas de acordo com seu local de origem e seu potencial de diferenciação. A imagem representa as fases do desenvolvimento, indo desde a fecundação até a fase adulta, bem como os tipos de células-tronco encontradas em cada etapa. O desenho esquemático foi elaborado a partir do acervo disponível no aplicativo BioRender (<https://biorender.com/>). Fonte: adaptado de (ANDRZEJEWSKA; LUKOMSKA; JANOWSKI, 2019).

1.6.1 Células-tronco adultas: as células-tronco mesenquimais

As células-tronco adultas, também conhecidas como células-tronco somáticas ou células-tronco residentes, podem ser extraídas do feto em estágio avançado de desenvolvimento ou diretamente de tecidos adultos, sendo assim multipotentes. Acredita-se que as células-tronco adultas estão presentes em todos os tecidos, onde exercem o papel de manutenção da homeostase tecidual. Esse processo é regulado através do balanço entre a autorrenovação, responsável por manter uma quantidade constante e mínima de células residentes no tecido, e da diferenciação, a qual atua na regeneração de danos teciduais e na reposição de células especializadas do tecido (revisado por GURUSAMY et al., 2018).

As células-tronco mesenquimais (CTMs) ou estromais são destaque entre os diversos tipos de células-tronco adultas disponíveis (CAPLAN, 2017). Em 2006, foram estabelecidos os critérios básicos para caracterização de células-tronco adultas como CTMs, sendo eles: 1) capacidade de crescimento *in vitro* como uma população celular aderente ao substrato, 2) apresentar morfologia fibroblástica, 3) expressar uma série de marcadores de superfície celular (CD105, CD73 e CD90) bem como demonstrar a ausência de outros (CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR) e 4) as CTMs devem apresentar a habilidade de se diferenciarem em adipócitos, osteoblastos e condrócitos (DOMINICI et al., 2006). Até o momento, as CTMs foram isoladas com sucesso a partir do cordão umbilical e da placenta de recém-nascidos, bem como de

tecidos adultos, como sangue periférico e menstrual, polpa dentária, medula óssea e tecido adiposo (revisado por ANDRZEJEWSKA; LUKOMSKA; JANOWSKI, 2019).

Como mencionado anteriormente, a capacidade de diferenciação celular é um dos fatores determinantes para caracterização de CTMs, além de ser essencial para a manutenção da homeostase e regeneração tecidual no organismo vivo (POST; CLEVERS, 2019). A diferenciação adipogênica, por exemplo, é responsável pela formação dos adipócitos que irão compor o tecido adiposo, o qual tem função primordial de promover a homeostase corporal energética através do acúmulo de ácidos graxos e lipídios em adipócitos maduros (CHOE et al., 2016). Por outro lado, a diferenciação osteogênica determina a formação dos osteoblastos produtores da parte orgânica da matriz óssea e que, em conjunto com os osteoclastos, atuam na renovação e remodelação do tecido ósseo (CHEN et al., 2016; HANNA; MIR; ANDRE, 2018).

Além da capacidade de autorrenovação e de diferenciação, as CTMs atraíram atenção especialmente pelo fato de não estarem sujeitas a questões éticas e legais associadas ao uso de células-tronco de origem embrionária, uma vez que podem ser facilmente obtidas através de procedimentos minimamente invasivos. Um exemplo disso são as células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSCs), as quais podem ser isoladas a partir de resíduos de gordura gerados em cirurgias de lipoaspiração ou de dermolipectomia, sendo esta uma excelente fonte de CTMs (NAE et al., 2013; NAJI et al., 2019). Como células multipotentes, as ADSCs tem a capacidade de dar origem a múltiplos fenótipos celulares, mas são responsáveis também por promoverem a regeneração tecidual por meio da estimulação da proliferação celular local (KOCAN et al., 2017) e por secretarem fatores tróficos que regulam a sinalização parácrina através de citocinas angiogênicas, hematopoiéticas e pró-inflamatórias, por exemplo (KILROY et al., 2006).

Tendo em vista a biologia básica geral das CTMs e as vantagens apresentadas para as ADSCs, não é surpresa que estas células sejam exploradas em diferentes campos da medicina regenerativa, terapia celular e no estudo de doenças metabólicas (BAJEK et al., 2016; CHOE et al., 2016; ZHANG et al., 2020). Recentemente, as ADSCs passaram a ser exploradas também no desenvolvimento de modelos *in vitro* para ensaios de citotoxicidade, especialmente para *triagem* inicial de novas drogas, trazendo uma nova perspectiva para a área da toxicologia (ABUD et al., 2015).

1.7 CÉLULAS-TRONCO COMO MODELO PARA ENSAIOS DE TOXICIDADE

Em face do desenvolvimento constante de novos materiais com propriedades cada vez mais inovadoras e únicas, como as NPs, a área da toxicologia encontra-se em permanente busca pelo aprimoramento de métodos de avaliação de segurança que sejam rápidos e relevantes para predição da toxicidade em humanos. Com o crescimento dos movimentos pela redução dos testes em animais, atualmente os ensaios *in vitro* são considerados o ponto de partida para avaliação toxicológica. (ESKES et al., 2017). Assim, a escolha de um modelo *in vitro* biologicamente relevante é uma das etapas essenciais para que os ensaios de toxicidade possam mimetizar ao máximo as condições fisiológicas *in vivo* de sistemas biológicos expostos à compostos potencialmente tóxicos (HUSSAIN et al., 2015).

Tradicionalmente, os testes de citotoxicidade são executados com linhagens celulares devido a disponibilidade comercial e facilidade de manutenção em condições experimentais controladas. Entretanto, células de linhagens humanas são comumente imortalizadas e muitas vezes originadas a partir de células tumorais, estando propensas a instabilidade genética e alterações fenotípicas que não são representativas do tecido original. Ainda, muitas células de linhagem são transformadas também a partir de tecidos de origem animal, como ratos e camundongos, o que reduz a capacidade preditiva destas células em relação a sistemas humanos. As células primárias humanas, por sua vez, apresentam genótipo melhor definido e oferecem uma visão mais acurada de sistemas biológicos *in vivo*, embora a dificuldade e as questões éticas envolvendo o isolamento de células humanas e a capacidade limitada de passagens em cultura sejam pontos limitantes no emprego destas células (JENNINGS, 2015; SCANU; MANCUSO; CAO, 2011).

Nessa perspectiva, as CTMs tornaram-se um modelo alternativo para avaliação da toxicidade de diferentes substâncias químicas (ABUD et al., 2015; ESKES et al., 2017), incluindo NPs (MANCUSO; CAO, 2014). Embora sejam células primárias, as CTMs podem ser obtidas a partir de tecidos humanos destinados para descarte, como as ADSCs, reduzindo as questões éticas acerca de seu isolamento (NAE et al., 2013). Além disso, em vista de suas características biológicas intrínsecas, as CTMs são consideradas um ótimo modelo preditivo de toxicidade humana pois permitem a avaliação de efeitos citotóxicos sobre a proliferação, sobrevivência e ainda durante a

diferenciação celular, o que pode revelar danos às funções celulares específicas de células-tronco (KIM; CHE; YUN, 2019; MORI; HARA, 2013).

A diferenciação celular é, de fato, a função biológica de CTMs mais explorada em ensaios de toxicidade. Por ser um processo finamente regulado, a diferenciação está sujeita à influência de compostos químicos, como NPs, que podem resultar em respostas tóxicas ainda não elucidadas (KOHL et al., 2011). Diferentes estudos apontam, por exemplo, que NPs metálicas têm a capacidade tanto de estimular quanto de inibir a diferenciação celular de CTMs (revisado por ZHOU et al., 2018). Foi observado ainda que NPs de prata foram capazes de inibir (SENGSTOCK et al., 2014) e também promover a diferenciação adipogênica de CTMs (HE et al., 2016), ao passo que NPs à base de ouro não afetaram a adipogênese mas estimularam a diferenciação osteogênica de células-tronco (CHOI et al., 2015; NIU et al., 2017). Dessa forma, tendo em vista que a diferenciação é um processo altamente regulado e já se sabe que diferentes NPs podem afetar esse processo, a diferenciação celular de CTMs pode ser empregada como indicador de citotoxicidade de NPs (MURGIA et al., 2016).

Assim, o emprego de CTMs como modelo *in vitro* pode fornecer resultados relevantes acerca dos mecanismos tóxicos pelos quais as BiNPs de síntese física afetam células humanas, o que ainda não foi investigado até o momento, permitindo a avaliação de potenciais efeitos tóxicos nos processos de autorrenovação e diferenciação celular (LIU et al., 2013). Considerando que as BiNPs são investigadas especialmente quanto suas aplicações biomédicas, a correlação entre seu potencial de aplicação e os riscos toxicológicos é uma etapa que deve anteceder uma possível comercialização destas NPs (REUS et al., 2018), de forma a garantir que as BiNPs disponibilizadas sejam altamente eficazes e seguras para utilização em sistemas biológicos humanos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de nanopartículas de bismuto produzidas através do método de síntese física de ablação a laser em meio líquido sobre o comportamento celular e potencial de autorrenovação e diferenciação de células-tronco derivadas do tecido adiposo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a solução coloidal de BiNPs quanto às suas propriedades físico-químicas;
- Avaliar a citotoxicidade da solução coloidal de BiNPs na viabilidade celular relativa em ADSCs;
- Analisar os efeitos ultraestruturais da interação entre a solução coloidal de BiNPs e ADSCs;
- Avaliar a influência da solução coloidal de BiNPs na atividade mitocondrial de ADSCs;
- Avaliar os efeitos da solução coloidal de BiNPs na proliferação celular de ADSCs;
- Avaliar os efeitos da solução coloidal de BiNPs sobre os processos de diferenciação adipogênica e osteogênica de ADSCs.

3 METODOLOGIA

3.1 DROGAS E REAGENTES

Para execução dos protocolos experimentais foram utilizados alvos de bismuto metálicos de alta pureza, penicilina/estreptomicina, vermelho neutro (VN), brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI), paraformaldeído (PFA), dimetilsufóxido (DMSO), carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP), insulina, dexametasona, indometacina, 3 isobutil-1-metilxantina (IBMX), vermelho nilo e β -mercaptoetanol (Sigma Aldrich, Sant Louis, EUA). Meio Dulbecco MEM (DMEM), soro fetal bovino (SFB), L-glutamina, anticorpo secundário anti-coelho IgG 488 (A21206) e Click-iT™ EdU Cell Proliferation Kit for Imaging AlexaFluor™ 594 (Gibco Invitrogen, Carlsbad, EUA). Albumina sérica bovina (BSA), MitoTracker® Orange CMTMRos e MitoTracker® Green FM (ThermoFisher, Waltham, EUA). Etanol, ácido acético glacial e isopropanol absoluto (Merck, Whitehouse Station, EUA). JC-10 *potential membrane* kit e anticorpo policlonal primário anti-Ki-67 (ab15580) (Abcam, Cambridge, EUA). Human Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium Bullet Kit™ e kit OsteoImage™ Mineralization (Lonza®, Walkersville, EUA). RNEasy mini kit e DNase (Qiagen™, Maryland, EUA). Kit ImProm-II™ Reverse Transcription System, RNase Out e GoTaq Polymerase Mix (Promega®, Madison, EUA).

3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE BiNPs

BiNPs foram sintetizadas através do método de LASiS pelo laboratório FotoNanoBio da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Para cada lote de produção independente, um alvo de bismuto metálico de alta pureza foi imerso em 50 ml de água ultrapura estéril e irradiado no comprimento de onda de 1064 nm de um laser Nd:YAG (Quantronix, Hauppauge, NY, EUA) na frequência de 1,4 KHz e potência de 5 W. Cada ablação teve duração de 5 minutos, sendo o laser direcionado ao alvo de bismuto por meio de uma lente focal de 5 cm. Após a síntese, os lotes de BiNPs foram estabilizados com 2,5 ml de BSA 1% para uma concentração final de 0,05% de BSA por amostra (REUS et al., 2018). Para garantir que todos os lotes

utilizados apresentassem características semelhantes, as BiNPs foram avaliadas quanto suas propriedades físico-químicas por diferentes metodologias.

A presença do elemento químico bismuto na solução coloidal de BiNPs foi confirmada por espectroscopia ultravioleta visível (UV/VIS). Para tanto, alíquotas de 1 ml de BiNPs recém-sintetizadas foram transferidas para cubetas de quartzo e analisadas em espectrômetro UV/VIS (Ocean Optics, Dunedin, FL, EUA; espectrômetro modelo USB2000+). A obtenção de picos plasmônicos com comprimento de onda de 250 – 260 nm foi considerada característica da presença de bismuto, conforme previamente estabelecido em trabalhos anteriores do grupo FotoNanoBio da UTFPR (BEZERRA et al., 2017).

A frequência de distribuição de tamanho das BiNPs foi determinada através das técnicas de espalhamento dinâmico da luz (DLS) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para a análise de DLS, alíquotas de 1 ml de diferentes lotes de BiNPs foram transferidas para cubetas de quartzo e lidas no analisador de partículas Microtrac (Largo, FL, EUA, modelo Nanotracs Ultra). Os dados foram analisados pelo software FLEX 10.6.0 e interpretados também pelos pesquisadores parceiros do grupo FotoNanoBio. Para determinação da dispersão de tamanho por MET, grades de níquel contendo BiNPs foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM 1400 Plus, Jeol, Tóquio, Japão) e fotografadas pelo software TEM Center for JEM-1400 Plus. Foram preparadas 3 grades recobertas com formvar 0,5% para cada lote produzido, sendo fotografados 5 campos diferentes em cada uma delas, totalizando 15 fotos para cada lote. As imagens foram analisadas no programa ImageJ (versão 1.45d; The National Institute of Health, EUA), sendo contabilizadas somente BiNPs com tamanho maior que 1 nm e circularidade entre 0,60 e 1,00 nm. Os dados brutos expressos em área foram convertidos em diâmetro no programa Microsoft Office Excel e posteriormente analisados no GraphPad Prism® 6.0. As fotografias provenientes da MET também foram empregadas para caracterização morfológica visual das BiNPs.

A análise do potencial zeta para detecção da estabilidade da solução coloidal de BiNPs foi realizada pelo Instituto SENAI de Inovação em Eletroquímica. Para essa técnica, alíquotas de 1 ml da solução de BiNPs (3 lotes de BiNPs armazenados por aproximadamente 8 meses após a síntese ao abrigo da luz e em temperatura de 2 a 8° C) foram transferidas para cubetas de acrílico e analisadas no Zeta Potential Analyzer (Brookhaven, Nova Iorque, EUA; modelo Zeta PALS). Os dados foram

adquiridos e interpretados pelo software BIC Particle Solutions (Brookhaven, Nova Iorque, EUA), seguindo o protocolo interno estabelecido pelo setor. Foram realizadas 5 leituras por amostra, sendo o resultado final expresso em média \pm desvio padrão.

Após a caracterização completa, os lotes de produção de BiNPs foram armazenados na temperatura de 2 a 8° C ao abrigo da luz até o momento da realização dos experimentos.

3.3 CULTIVO CELULAR

ADSCs comercialmente adquiridas (Lonza®, Walkersville, EUA; número de catálogo PT-5006) foram cultivadas em meio de rotina composto por DMEM suplementado com SFB 10% e 4 mM L-glutamina, em atmosfera umidificada com 5,0% de CO₂ a 37 °C. O meio de cultura foi renovado duas vezes por semana até as células atingirem confluência superior a 90%, momento no qual as células foram subcultivadas para expansão do cultivo celular ou plaqueadas para execução dos experimentos. Todos os ensaios foram realizados com ADSCs entre as passagens 4 e 8, conforme instruções do fabricante.

3.4 PREPARAÇÃO DE BiNPs PARA ENSAIOS *IN VITRO*

As BiNPs foram sonicadas (Branson 1510 Ultrasonic Cleaner, Gaithersburg, Maryland, EUA) durante 30 minutos em temperatura ambiente (20 a 25° C) antes da realização dos experimentos. Posteriormente, as diferentes concentrações de BiNPs empregadas nos ensaios foram preparadas em meio de diluição de drogas, composto por DMEM suplementado com 4 mM de L-glutamina e 100U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Para todos os ensaios biológicos foram testados 3 lotes de produção independente de BiNPs.

3.5 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR RELATIVA

Para verificar a citotoxicidade das BiNPs sobre ADSCs, a viabilidade celular relativa foi avaliada através das técnicas de captação do vermelho neutro (VN), ensaio do MTT e quantificação nuclear após marcação com DAPI. Para tanto, ADSCs foram cultivadas em placas de 96 poços (3,5 x 10³ células/poço) por 24 horas. Após, as

células foram expostas a BiNPs na faixa de concentração de 23,25 – 345 µg/ml (fator de diluição: 1:1,47) durante 48 horas. ADSCs tratadas somente com meio de cultura foram consideradas como controle negativo.

O ensaio do VN foi revelado conforme protocolo previamente estabelecido em nosso laboratório (ABUD et al., 2015). Após 48 horas de exposição, as células foram lavadas com 250 µl/poço de D-PBS (solução salina fosfatada com cálcio e magnésio) em temperatura ambiente e incubadas com 250 µl/poço de solução de VN (25 µg/ml) (VN diluído em DMEM suplementado com 5% de SFB, 4mM de L-glutamina, 100U/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina) a 37 °C e 5,0% de CO₂ durante 3 horas. Seguido este período, as células foram lavadas com 250 µl/poço de D-PBS e o corante foi extraído com a adição de 100 µl/poço de solução dessorbante (50% etanol, 49% ácido acético glacial, 1% de água ultrapura). A placa foi mantida sob agitação por 20 minutos no escuro em temperatura ambiente e, em seguida, a leitura da absorbância no comprimento de onda de 540 nm foi realizada em leitor de placas (Biotek, Winooski, Vermont, EUA).

Para a revelação do ensaio do MTT, as células foram lavadas duas vezes com D-PBS e, em seguida, incubadas com 100 µl/poço de solução de MTT (0,5 mg/ml) por 4 horas a 37 °C e 5,0% de CO₂. Ao final do período de incubação, a solução de MTT foi removida e os cristais de formazan foram extraídos com a adição de 100 µl/poço de isopropanol absoluto. As placas foram mantidas sob agitação durante 5 minutos no escuro também em temperatura ambiente e a leitura da absorbância foi realizada em leitor de placas (Biotek, Winooski, Vermont, EUA) no comprimento de onda de 550 nm (VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011).

As células destinadas a quantificação nuclear com DAPI foram lavadas duas vezes com 200 µl/poço de PBS aquecido (37 °C) e fixadas com 50 µl/poço de PFA 4% durante 10 minutos. Ao final desse período, as células foram lavadas novamente com 200 µl/poço de PBS e os núcleos marcados com 50 µl/poço de DAPI (1 µg/ml) por 10 minutos. Após três lavagens com 200 µl/poço de PBS, as placas foram armazenadas com o tampão ao abrigo da luz e em temperatura de 2 – 8° C até a leitura. As placas foram analisadas em sistema de *high content imaging* Operetta CLS™ (Perkin Elmer), onde adquiriram-se 13 fotos por poço na objetiva de 20X (excitação [Ex] = 355/385 nm e emissão [Em] = 430/500 nm), sendo as imagens posteriormente examinadas no software Harmony® 4.8 (Perkin Elmer).

3.5.1 Ensaio de viabilidade celular relativa após exposição prolongada a BiNPs

A partir dos ensaios de viabilidade celular relativa, foram escolhidas concentrações não citotóxicas para serem avaliadas durante a diferenciação celular de ADSCs. Uma vez que os experimentos de diferenciação adipogênica e osteogênica são realizados durante 14 e 21 dias, respectivamente, buscou-se avaliar o efeito das concentrações selecionadas em células-tronco indiferenciadas durante estes tempos.

Para tanto, ADSCs foram cultivadas na densidade de $3,5 \times 10^3$ células/poço em placas de 96 poços e incubadas a 37 °C e 5,0% de CO₂ por 24 h. No dia seguinte, as células receberam o tratamento com BiNPs na faixa de concentração de 0,94 a 200 µg/ml (fator de diluição: 1:2,15). Foram selecionadas duas estratégias de exposição distintas para as BiNPs, conforme demonstrado na figura 6. Na exposição única, as células receberam o tratamento com BiNPs no dia 0 e, a partir do dia 4, foram mantidas apenas com meio de cultura, o qual foi renovado a cada 3 – 4 dias de experimento. Já na exposição repetida, tanto o meio de cultura quanto o tratamento com as diferentes concentrações de BiNPs foram renovados a cada 3 ou 4 dias de experimento.

No décimo quarto e vigésimo primeiro dia de experimento, as células foram submetidas ao mesmo protocolo de fixação e coloração utilizado nos ensaios de viabilidade celular relativa com DAPI, conforme descrito no item 4.4.1. As placas foram submetidas a leitura em sistema *high content imaging* Operetta CLS™ (Perkin Elmer), onde adquiriram-se 13 fotos/poço na objetiva de 20X, sendo os dados analisados através do software Harmony 4.8 (Perkin Elmer). Foram realizados três experimentos independentes para cada tempo e estratégia de exposição.

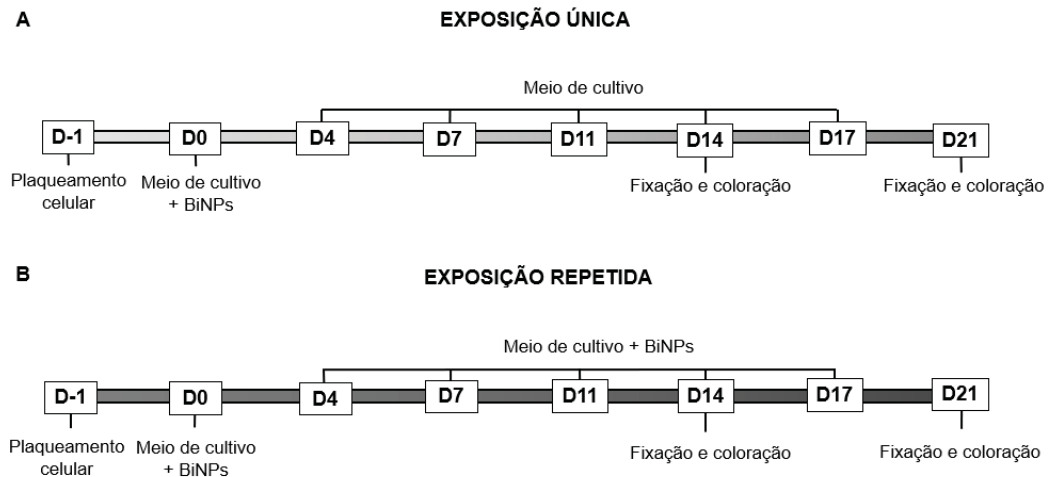


Figura 6: Representação esquemática das estratégias de exposição empregadas para avaliação da viabilidade celular após exposição prolongada as BiNPs. A) Na exposição única, as células receberam o tratamento com BiNPs no dia 0 do experimento e, a partir do dia 4, foram mantidas apenas com meio de cultura; B) Na exposição repetida, o tratamento com as BiNPs foi renovado a cada 3 ou 4 dias de experimento. Os experimentos com duração de 14 dias tiveram as trocas de meio realizadas nos dias 4, 7 e 11 e foram fixadas e coradas no décimo quarto dia, ao passo que os experimentos de 21 dias tiveram o meio de cultura renovado nos dias 4, 7, 11, 14 e 17 e a fixação e coloração realizados no vigésimo primeiro dia de experimento. Fonte: a autora (2021).

3.6 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA INTERAÇÃO ENTRE BiNPs E ADSCs

A avaliação ultraestrutural da interação entre as BiNPs e as ADSCs foi realizada por MET. Dessa forma, as ADSCs foram cultivadas em placas de 6 poços ($0,5 \times 10^5$ células/poço) e expostas a 34,19 $\mu\text{g/ml}$, 108,60 $\mu\text{g/ml}$ e 302,24 $\mu\text{g/ml}$ de BiNPs por 48 horas. ADSCs tratadas somente com meio de cultura foram consideradas como controle negativo. A preparação subsequente das células para MET foi realizada pela equipe da Plataforma de Microscopia Confocal e Eletrônica do Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ-PR). As células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 1 hora e armazenadas a 4°C. Após, as células foram lavadas 3 vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e então foram soltas da placa com auxílio de um espalhador de células, e transferidas para um tubo. O *pellet* de células seguiu para a pós-fixação com 1% de tetróxido de ósmio, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M com 0,8% de ferrocianeto de potássio e 5 mM de cloreto de cálcio, por 45 minutos a temperatura ambiente, no escuro. Após lavagens com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e foram emblocadas em resina epóxi (EMbed-812, Electron Microscopy Sciences). As

amostras foram polimerizadas a 60°C por 72 horas. Cortes ultrafinos (70-90 nm) foram obtidos com o ultramicrotomo Leica EM UC6 (Leica) e contrastados com acetato de uranila 5% por 45 minutos e com citrato de chumbo por 5 minutos. As imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM1400-Plus (JEOL JEM-1400 Plus, Jeol, Tóquio, Japão), sendo posteriormente analisadas no software ImageJ (ImageJ versão 1.45d; The National Institute of Health, EUA).

3.7 ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DO EFEITO DE BiNPs SOBRE A FUNÇÃO E ESTRUTURA MITOCONDRIAL

3.7.1 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Visando avaliar os efeitos de BiNPs sobre a atividade mitocondrial de ADSCs, o potencial de membrana mitocondrial foi determinado através da marcação com os corantes JC-10 e MitoTracker® Orange CMTMRos. Sendo assim, ADSCs foram plaqueadas em placas de 96 poços transparentes (JC-10) ou com paredes pretas (MitoTracker® Orange) na densidade de $3,5 \times 10^3$ células/poço e mantidas a 37 °C e 5,0% de CO₂ durante 24 horas. Em seguida, as células foram tratadas com 34,19; 108,60; 234,19 e 302,24 µg/ml de BiNPs, concentrações as quais foram previamente determinadas a partir do ensaio do MTT, durante 48 horas a 37 °C e 5,0% de CO₂. ADSCs tratadas com DMSO (1%) foram consideradas como controle.

Para o ensaio do JC-10, o meio contendo BiNPs foi descartado e as células receberam 50 µl/poço do corante, conforme instruções do fabricante. Após 30 minutos de incubação a 37° C com 5% de CO₂, a intensidade de fluorescência basal do JC-10 ([Ex/Em] = 495/525 nm e [Ex/Em] = 540/590 nm) foi quantificada em sistema *high content imaging* Operetta CLS™ (Perkin Elmer) também a 37° C com 5% de CO₂. Imediatamente após a leitura, as células foram incubadas por 20 minutos com 20 µl/poço de CCCP (carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona) (5 µM), um agente químico capaz de promover a despolarização completa da membrana mitocondrial (LI et al., 2018a). A intensidade de fluorescência foi lida novamente nas condições descritas anteriormente. O potencial de membrana mitocondrial foi expresso como a razão média entre a intensidade de fluorescência basal e a intensidade de fluorescência após despolarização completa com CCCP ($\Delta F/\Delta F_{cccp}$). O potencial de células

tratadas com BiNPs foi analisado em relação ao potencial das células não tratadas (DMSO 1%).

Para a marcação com MitoTracker® Orange CMTMRos, corante fluorescente que marca mitocôndrias de maneira dependente ao potencial de membrana mitocondrial (BUCKMAN et al., 2001), as ADSCs foram lavadas duas vezes com 200 µl/poço de PBS aquecido (37 °C) para remoção do meio contendo BiNPs. Em seguida, as células foram fixadas com PFA 4% por 15 minutos a temperatura ambiente e, posteriormente, lavadas mais duas vezes com 200 µl/poço de PBS. As células foram então coradas com 50 µl/poço de MitoTracker® Orange CMTMRos (200 nM) por 1 hora ao abrigo da luz em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas com 200 µl/poço de PBS e imediatamente incubadas no escuro com 50 µl/poço de DAPI (1 µg/ml) por 10 minutos para marcação nuclear. O excesso de DAPI foi removido com mais duas lavagens com 200 µl/poço de PBS, sendo o tampão mantido nas placas até o momento da leitura. Nesse ensaio, as células foram submetidas à microscopia confocal no aumento de 40X em sistema *high content imaging* Operetta CLS™ (Perkin Elmer) e as imagens foram analisadas pelo software Harmony® 4.8 (Perkin Elmer), seguindo-se protocolo fornecido pelo fabricante. Os resultados foram expressos em número de núcleos e intensidade média de fluorescência, sendo analisados em relação as células não tratadas.

3.7.2 Determinação da massa mitocondrial com MitoTracker® Green FM

De forma a determinar a influência das BiNPs sobre a massa e morfologia mitocondrial de ADSCs, as células foram submetidas a marcação mitocondrial com o corante MitoTracker® Green FM, o qual marca mitocôndrias independentemente de seu potencial de membrana. Para tanto, ADSCs foram plaqueadas na densidade de $3,5 \times 10^3$ células/poço em placas de 96 poços de fundo transparente e paredes pretas (Greiner Bio-One®, Americana, São Paulo, Brasil) e cultivadas por 24 horas. Em seguida, as células foram expostas a 34,19; 108,60; 234,19 e 302,24 µg/ml de BiNPs ou DMSO 1% (controle negativo) por 48 horas a 37° C e 5% de CO₂, seguindo as mesmas concentrações previamente empregadas para determinação do potencial de membrana mitocondrial. Passado o período de incubação, as células foram fixadas, marcadas e analisadas seguindo o mesmo protocolo descrito na seção 3.6.1 para o

corante MitoTracker® Orange. Os resultados foram igualmente expressos como número de núcleos e intensidade média de fluorescência.

3.8 ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

A possível influência das BiNPs sobre a proliferação celular de ADSCs foi avaliada pelos ensaios de imunomarcação de Ki-67 e incorporação do corante EdU. Para esses ensaios, ADSCs foram cultivadas em placas de 96 poços ($3,5 \times 10^3$ células/poço) por 24 horas. Passado esse período, as células foram tratadas com diferentes concentrações de BiNPs (23,25; 34,19; 50,25; 108,60; 234,19 e 302,24 $\mu\text{g/ml}$) escolhidas a partir dos ensaios de citotoxicidade e incubadas a 37 °C e 5,0% de CO₂ durante 48 horas. O controle negativo foi tratado somente com DMSO 1% (veículo).

Para a imunomarcação de Ki-67, os cultivos foram lavados duas vezes com 200 μl /poço de PBS aquecido (37 °C) e fixados com PFA 4% por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas mais duas vezes com 200 μl /poço de PBS aquecido e permeabilizadas com 50 μl /poço de solução de PBS contendo 0,5% de Triton X-100 por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram bloqueadas com 50 μl /poço de PBS/BSA 1% por 1 hora sob agitação suave (100 rpm). As células foram então incubadas com 30 μl /poço do anticorpo policlonal primário anti-Ki-67 (1:300) durante 24 horas a 4° C em câmara úmida. Ao final da incubação, as células foram submetidas a três lavagens com 100 μl /poço de PBS aquecido sob agitação (100 rpm), respeitando o intervalo de 5 minutos para cada lavagem. A seguir, as placas foram incubadas com 30 μl /poço do anticorpo secundário anti-coelho IgG 488 (1:600) por 1 hora ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas três vezes com 100 μl /poço de PBS por 5 minutos sob agitação constante (100 rpm) e, após, os núcleos foram corados com 50 μl /poço de DAPI (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 10 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. O excesso de DAPI foi retirado com três lavagens de 5 minutos com 100 μl /poço PBS, sendo o tampão mantido sobre as células até o momento da leitura ao abrigo da luz na temperatura de 2 – 8° C.

O ensaio do EdU foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (Click-iT™ EdU Cell Proliferation Kit for Imaging AlexaFluor™ 594, Invitrogen® Carlsbad, California, EUA), com algumas modificações. Após 24 horas de exposição

às BiNPs, o corante EdU (5 μM) diluído em PBS foi adicionado às células, que permaneceram em cultura por mais 24 horas, totalizando 48 horas de exposição às BiNPs. Os núcleos foram corados com 100 μl /poço de Hoechst 33342 (1:2000) por 30 minutos em ambiente protegido da luz. As células foram lavadas duas vezes com 100 μl /poço de PBS aquecido e as placas armazenadas com o tampão ao abrigo da luz na temperatura de 2 – 8° C.

A análise quantitativa da imunomarcação de Ki-67 ([Ex] = 460/490 nm e [Em] = 500/550 nm) e da incorpora o de EdU ([Ex] = 495/525 nm e [Em] = 540/590 nm) foi realizada através do sistema de *high content imaging* Operetta CLS™ (Perkin Elmer) (13 fotos/poço) e do software Harmony® 4.8 (Perkin Elmer). Para tanto, os núcleos foram selecionados de acordo com a marca o do núcleo para DAPI ou Hoechst, sendo consideradas células com núcleo de tamanho entre 50 - 500 μm e circularidade de 0,90 μm . As células da borda foram excluídas para evitar dupla contagem e o *cutoff* de intensidade para considerar as células positivas para marca o foi de 4500 RFU para ambos os experimentos. Os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas para Ki-67 ou para EdU em rela o ao número total de células em cada poço.

3.9 ENSAIOS DE DIFERENCIA O CELULAR

3.9.1 Diferencia o adipogênica

Para avalia o da influência de concentra es não citotóxicas de BiNPs sobre a diferencia o adipogênica, ADSCs foram cultivadas ($3,5 \times 10^3$ células/poço) em placas de 96 poços durante 24 horas. No dia seguinte, as células receberam 50 μl /poço de meio de indu o adipogênica (DMEM suplementado com 10% de SFB, 4 mM de L-glutamina, 100 U/ml penicilina e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de insulina, 2 μM de dexametasona, 400 μM de indometacina e 1 mM de IBMX) e 50 μl /poço do tratamento com BiNPs na faixa de concentra es de 0,94 a 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (fator de dilui o: 1:2,15). Similarmente ao ensaio de viabilidade celular prolongada, as ADSCs foram submetidas a duas estratégias distintas de exposi o a BiNPs. Na exposi o única, as BiNPs foram adicionadas às ADSCs no dia 0 e permaneceram em cultura por apenas 3 dias (Fig. 6A), ao passo que na exposi o repetida as BiNPs foram adicionadas a cada troca de meio, permanecendo em cultura durante todo o

experimento (Fig. 6B). O meio de indução adipogênica (com ou sem BiNPs) foi renovado a cada 3 – 4 dias durante 14 dias no total.

No décimo quarto dia após a indução, as ADSCs foram lavadas duas vezes com 200 µl/poço de PBS aquecido (37 °C) para remoção do meio de cultura contendo BiNPs e fixadas com 50 µl/poço de PFA 4% por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as gotículas intracelulares de gordura foram coradas com 50 µl/poço de vermelho nilo (1 µg/ml) durante 30 minutos ao abrigo da luz. Após mais duas lavagens com 200 µl/poço de PBS, os núcleos foram contrastados com 50 µl/poço de DAPI (1 µg/ml) por 10 minutos ao abrigo da luz. O corante foi removido com duas lavagens de 200 µl/poço de PBS e o tampão foi mantido em contato com as células a 2 – 8 °C até o momento da leitura. A intensidade de fluorescência da marcação com vermelho nilo ([Ex] = 485 e [Em] = 555) foi analisada em leitor de placas (Biotek®, Winooski, Vermont, EUA). Para quantificação do número de núcleos (células positivas para DAPI) ([Ex] = 355/385 nm e [Em] = 430/500 nm) e da área diferenciada ([Ex] = 460/490 nm e [Em] = 500/550 nm), foram adquiridas 13 fotos/poços no aumento de 20X em sistema *high content imaging* Operetta CLS™ (Perkin Elmer). As imagens foram analisadas no software Harmony® 4.8 (Perkin Elmer). Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência (leitor de placas), número de núcleos, área e porcentagem de diferenciação e analisados em relação a células tratadas somente com meio de indução adipogênica.

3.9.2 Diferenciação osteogênica

Os efeitos de concentrações não citotóxicas de BiNPs também foram avaliados sobre a diferenciação osteogênica de ADSCs. Para tanto, ADSCs foram plaqueadas na densidade de 2×10^3 células/poço e mantidas em cultura por 24 horas. Após esse período, as células receberam 50 µl/poço de meio de diferenciação osteogênica (Human Mesenchymal Stem Cell (hMSC) Osteogenic Differentiation Medium Bullet Kit™, Lonza®, Walkersville EUA; número de catálogo PT-3002) e 50 µl/poço do tratamento com BiNPs, também nas concentrações de 0,94 a 200 µg/ml (fator de diluição: 1:2,15). O meio de diferenciação osteogênica (com ou sem BiNPs) foi renovado a cada 3 – 4 dias durante 21 dias, seguindo-se os esquemas de exposição única e repetida descritos anteriormente (Fig. 6A – B). No vigésimo primeiro dia de experimento, as células foram lavadas duas vezes com 200 µl/poço de PBS aquecido

(37 °C) e fixadas com PFA 4% por 15 minutos. As ADSCs foram lavadas mais uma vez com 200 µl/poço de PBS e a matriz mineralizada foi evidenciada através da marcação com o kit OsteoImage™ Mineralization (Lonza®, Walkersville, USA; número de catálogo PA-1503), conforme instruções disponibilizadas pelo fabricante. Os núcleos foram marcados com 50 µl/poço DAPI por 10 minutos ao abrigo da luz, sendo as células posteriormente submetidas a mais três lavagens com 200 µl/poço de PBS. As placas foram armazenadas ao abrigo da luz na temperatura de 2 – 8 °C até a leitura dos experimentos. Em sistema *high content imaging*, foram adquiridas 13 fotos/poço no aumento de 20X para quantificação do número de núcleos ([Ex] = 355/385 nm e [Em] = 430/500 nm) e da área mineralizada ([Ex] = 435-460 e [Em] = 570-620). As imagens adquiridas foram posteriormente analisadas no software Harmony® 4.8 (Perkin Elmer). Os resultados foram expressos em número de núcleos, área de mineralização e porcentagem de diferenciação e analisados em relação a células tratadas somente com meio de indução.

3.10 ANÁLISE DOS MARCADORES MOLECULARES DA DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA

O efeito de concentrações não citotóxicas de BiNPs sobre a diferenciação adipogênica foi analisado também a nível molecular, através da avaliação da expressão do mRNA dos genes PPAR γ , C/EBP α , FABP4. Para tanto, ADSCs foram cultivadas ($0,5 \times 10^5$ células/poço) em placas de 6 poços e, após 24 horas, induzidas a diferenciação adipogênica (1 ml/poço). Em conjunto com a indução, as células receberam o tratamento (1 ml/poço) com três concentrações de BiNPs (9,36, 20,12 e 43,26 µg/ml) selecionadas a partir dos ensaios de diferenciação. Células tratadas somente com meio de cultura foram consideradas como controle. Seguindo os protocolos de exposição única e exposição repetida, o meio de cultura foi renovado a cada 3 – 4 dias durante 14 dias. No décimo quarto dia, as células foram submetidas a extração de RNA para análise da expressão dos marcadores de adipogênese.

3.10.1 Extração de RNA

A extração do RNA total de ADSCs após diferenciação adipogênica na presença de BiNPs foi realizada com o kit RNeasy Mini, seguindo as recomendações

do fabricante (Qiagen™, EUA). Inicialmente as células foram lavadas duas vezes com 1 ml de PBS e desagregadas com 600 µl de tampão de lise (disponível no kit) contendo β-mercaptoetanol (1:100). Em seguida, o lisado celular recebeu 600 µl de etanol 70% e o conteúdo foi transferido para colunas de purificação. Após três centrifugações a 8000 xg por 15 segundos com 350 µl de tampão de lavagem, os possíveis vestígios de DNA foram removidos através da incubação com 80 µl de DNase por 15 minutos à 30 °C. Posteriormente, as colunas foram lavadas duas vezes com 500 µl de tampão de lavagem diluído em etanol e centrifugadas a 10000 xg por 15 segundos. As membranas foram secas por centrifugação (10000 xg por 3 minutos) e o precipitado ressuspendido em 30 µl de água ultrapura livre de RNases. A quantidade final de RNA em cada amostra foi dosada com o Agilent NanoDrop® ND-1000 (ThermoFisher, Waltham, MA, EUA).

3.10.2 Síntese de cDNA

Para síntese do DNA complementar (cDNA), a reação com a enzima transcriptase reversa foi realizada com o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega®), seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total em volume total de 11,1 µl. Em seguida, as amostras receberam 1 µl de oligodT (0,5 µg/ml) e foram incubadas a 70 °C por 5 minutos e, em seguida, a 4 °C por outros 5 minutos. Após o resfriamento, cada amostra recebeu 8,9 µl do mix de reação composto por 4 µl de buffer ImProm 5x, 2,4 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTP (10 mM), 0,5 µl de RNase Out e 1 µl de transcriptase reversa. As amostras foram então incubadas por 5 minutos a 25 °C, seguida por uma segunda incubação de 1 hora a 42 °C e, por fim, uma incubação a 70 °C por 15 minutos. Em seguida, as amostras receberam 200 µl de água deionizada e o cDNA foi dosado em Agilent NanoDrop® ND-1000 (ThermoFisher, Waltham, MA, EUA). O cDNA foi armazenado a -20 °C até o momento do uso.

3.10.3 Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa (RT-qPCR)

O nível relativo de expressão dos transcritos de interesse da diferenciação adipogênica foi mensurado através de RT-qPCR com o uso do kit GoTaq Polymerase

Mix (Promega®) e do equipamento LightCycler® 96 (Roche®). Seguindo as instruções do fabricante, cada poço recebeu 7,5 µl do mix de reação composto por 0,5 µl de cada par iniciador (*primers*), 1,5 µl de água ultrapura e 5 µl de GoTaq, sendo, em seguida, adicionados 2,5 µl das amostras de cDNA. O programa de ciclos para as PCRs foi o seguinte: iniciação a 50° C por 2 minutos, desnaturação a 95° C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95° C por 25 segundos, anelamento e extensão a 60° C por 60 segundos. As sequências dos primers para os genes PPAR γ , C/EBP α , FABP4 e GAPDH humano, usado como gene normalizador, estão descritas na tabela 1.

Os dados foram analisados de acordo com a medida do ciclo de amplificação (Cq) disponibilizados pelo software do próprio LightCycler 96 (Roche®), calculando-se a diferença entre os valores médios de Cq dos genes avaliados em relação ao gene normalizador GAPDH (Δ Ct). Os dados de Δ Ct de cada gene nas diferentes concentrações de BiNPs testadas foram comparados com os dados das amostras sem tratamento (controle) ($\Delta\Delta$ Ct), seguindo-se a análise de $2^{-\Delta\Delta$ Ct} para demonstrar a expressão relativa do mRNA do gene em cada concentração testada.

Tabela 1: Sequências dos primers empregados nos experimentos de RT-qPCR. As sequências *forward* (F) e *reverse* (R) de cada primer foram listadas.

GENE	DESCRIÇÃO DO GENE	SEQUÊNCIA (5' → 3')
PPAR γ	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	F: ATTACAGCAAACCCCTATTCC R: GGCATCTCTGTGTCAACCAT
C/EBP α ^a	CCAAT enhancer binding protein alpha	-
FABP4	Fatty acid binding protein 4	F: ATGGGATGGAAAATCAACCA R: GTGGAAGTGACGCCTTTCAT
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F: GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC R: TGGTTCACACCCATGACGA

^aOs primers para o gene C/EBP α foram comercialmente adquiridos (Qiagen®, EUA).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados no programa de estatística Graphpad Prism versão 6.0. Primeiro, os dados foram analisados por meio do teste ANOVA de uma via e, quando apresentaram resultado significativo ($p < 0,05$), o pós-teste de Dunnett's

foi aplicado para comparação entre a média dos tratamentos e do controle. Todos os dados estão expressos em média \pm desvio padrão (DP).

4 RESULTADOS

4.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO COLOIDAL DE BiNPs

Vinte lotes independentes de BiNPs foram produzidos no laboratório FotoNanoBio da UTFPR através da técnica de LASiS (Apêndice 1), destes, somente 10 apresentaram estabilidade satisfatória e foram empregados na realização dos ensaios biológicos. A solução coloidal de BiNPs padrão possui coloração marrom característica (Fig. 7A), a alteração da coloração da solução de alguns lotes após a síntese (Fig. 7B) foi o primeiro indício de degradação das BiNPs observado. Através da avaliação desses lotes por MET foi constatado que as amostras com coloração alterada estavam associadas com a formação de espículas (Fig. 7C) ou aglomerados de NPs na solução (Fig. 7D). Sendo assim, esses lotes foram considerados em possível processo de degradação e não foram incluídos nas avaliações de efeitos biológicos.

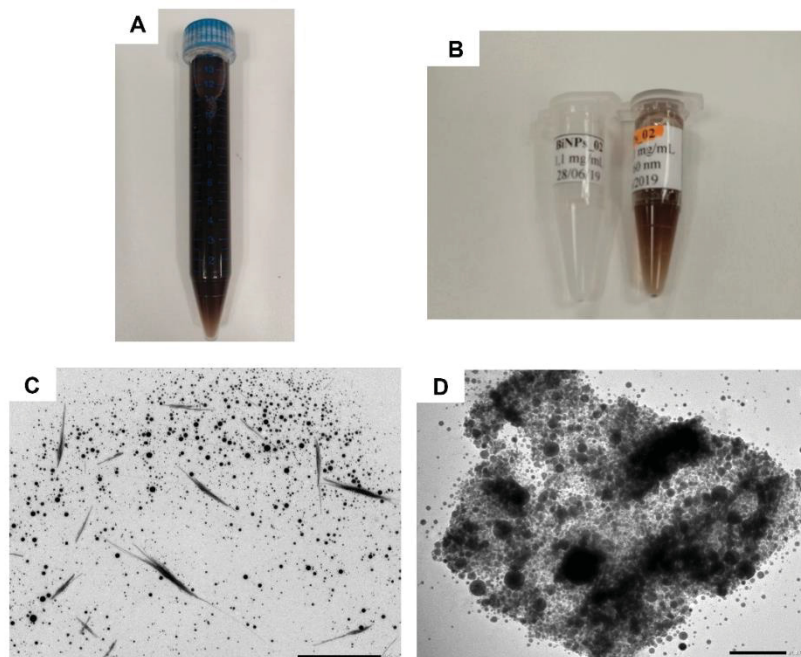


Figura 7: Lotes de produção de BiNPs desconsiderados para ensaios biológicos após caracterização físico-química. (A) As soluções coloidais de BiNPs produzidas por LASiS possuem coloração marrom escura característica da substância. (B) Alterações na coloração da solução de BiNPs. Em diferentes amostras, o tom marrom escuro das BiNPs foi gradualmente substituído pela coloração esbranquiçada. Análises de imagens de MET evidenciaram a presença de estruturas em forma de espícula (C) ou aglomerações de BiNPs (D) em lotes com alterações colorimétricas. Barra de escala = 1 μ M em (C) e 200 nm em (D).

De forma a garantir que todos os lotes utilizados apresentassem características equivalentes, as BiNPs foram submetidas a caracterização físico-química por diferentes metodologias (Apêndice 1). Conforme determinado por espectroscopia UV/VIS (Fig. 8A), as BiNPs apresentaram pico plasmônico característico no comprimento de onda de 250 – 260 nm, confirmando assim a presença do elemento bismuto nas amostras. A análise das imagens obtidas por MET demonstrou que as BiNPs se encontram dispersas em meio aquoso, apresentando morfologia esférica e tamanho heterogêneo (Fig. 8B). A ampla distribuição de tamanho das BiNPs foi confirmada por DLS (Fig. 8C), sendo evidenciada alta prevalência de NPs na faixa de tamanho de 60 – 75 nm. A distribuição de tamanho calculada de acordo com a MET foi menos ampla (Fig. 8D), identificando maior presença de BiNPs com tamanho entre 5 – 10 nm. Foi realizada a medida do potencial zeta em uma amostragem representativa (3 lotes) para determinação da carga superficial das BiNPs, sendo os valores de $-8,55 \pm 1,23$, $-3,72 \pm 0,59$ e $-3,55 \pm 1,28$ mV referentes aos lotes BiNPs_16, BiNPs_17 e BiNPs_18, respectivamente (Anexo 1). Com base nesses resultados, lotes independentes de BiNPs foram considerados equivalentes quanto a suas propriedades físico-químicas.

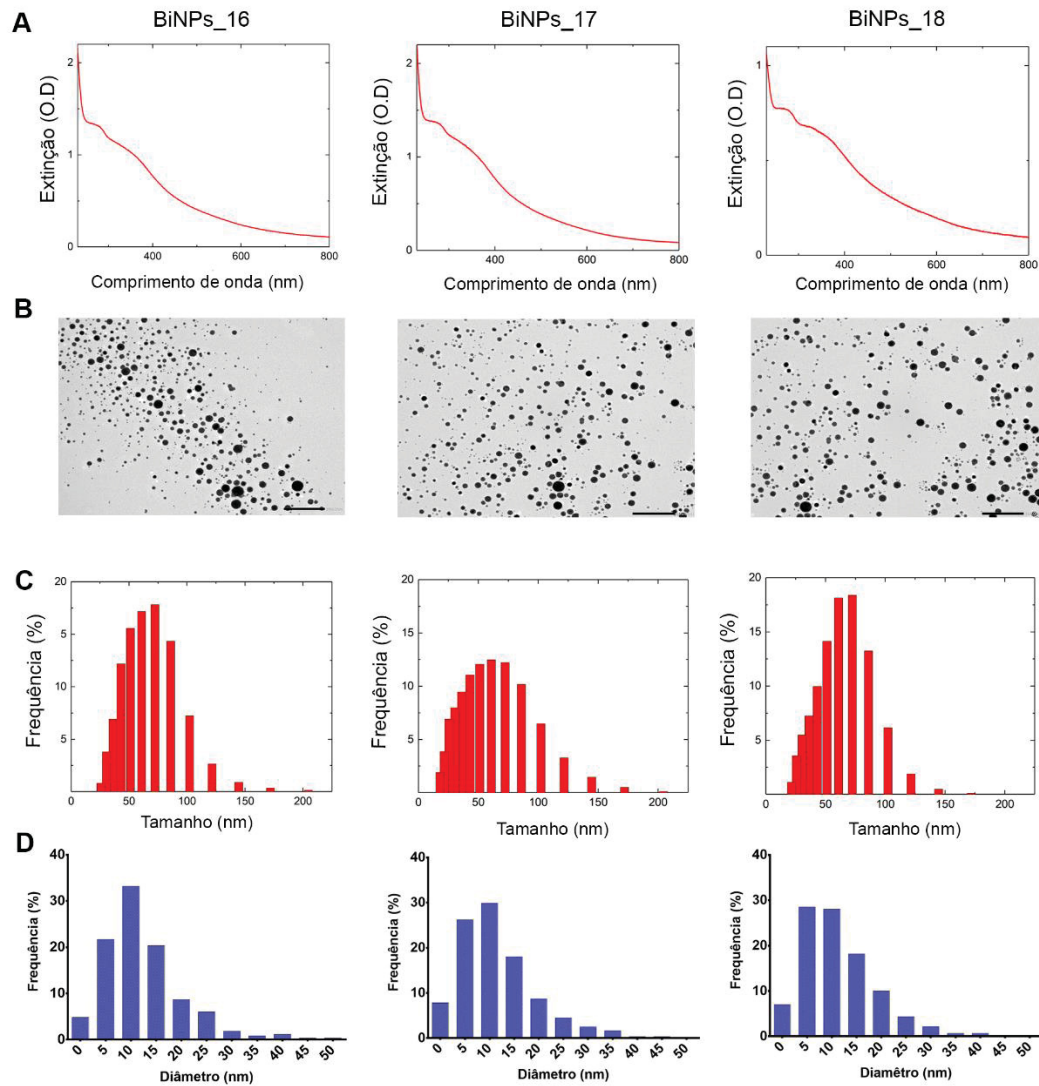


Figura 8: Caracterização físico-química de BiNPs produzidas por LASiS. Três lotes representativos de BiNPs (BiNPs_16, BiNPs_17, BiNPs_18) estão representados. (A) Determinação do pico plasmônico característico das BiNPs através de espectroscopia UV/VIS. (B) A morfologia das BiNPs foi determinada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A frequência de dispersão de tamanho das BiNPs em solução foi avaliada pelas técnicas de DLS (C) e MET (D). Escala = 200 nm.

4.2 CITOTOXICIDADE DA SOLUÇÃO COLOIDAL DE BiNPs EM ADSCs

A citotoxicidade de três lotes de produção independente de BiNPs foi determinada através da viabilidade celular relativa de ADSCs empregando-se os ensaios de VN, MTT e quantificação nuclear com DAPI. De acordo com esses ensaios, as BiNPs apresentaram baixa citotoxicidade, alterando a viabilidade celular apenas nas maiores concentrações testadas. A viabilidade celular relativa foi reduzida para $18,14 \pm 6,65\%$, $13,84 \pm 11,07\%$ e $30,03 \pm 4,76\%$ nos ensaios do VN, MTT e DAPI (Fig. 9A, B e C), respectivamente, após exposição a maior concentração de BiNPs testada

(345 $\mu\text{g/ml}$). A quantificação nuclear com DAPI indicou também efeito citotóxico na concentração de 234,69 $\mu\text{g/ml}$, sendo a viabilidade reduzida para $71,64 \pm 12,87\%$ (Fig. 9C). Por outro lado, o ensaio do MTT detectou um aumento de aproximadamente $42,90 \pm 15,23\%$ na formação de cristais de formazan em ADSCs expostas a concentrações mais baixas de BiNPs (23,25 - 50,23 $\mu\text{g/ml}$) (Fig. 9B). Essa alteração promovida por concentrações mais baixas não foi identificada nos ensaios do VN e do DAPI, sugerindo uma possível interferência das BiNPs com particularidades da técnica do MTT.

Com o intuito de confirmar que as BiNPs apresentaram capacidade citotóxica semelhante independente da técnica utilizada, a sensibilidade de cada método foi comparada a partir dos valores de concentração inibitória média (IC_{50}) determinados para cada metodologia. Não foram observadas diferenças significativas entre o IC_{50} das três técnicas, sendo os valores de $281,17 \pm 35,95 \mu\text{g/ml}$, $302,21 \pm 19,70 \mu\text{g/ml}$ e $282,58 \pm 26,01 \mu\text{g/ml}$ obtidos para o VN, MTT e DAPI, respectivamente (Fig. 9D e tabela 2). Dessa forma, a alta concordância entre os valores de IC_{50} de cada técnica sugere que embora cada técnica acesse a viabilidade celular por parâmetros e vias distintas, o padrão citotóxico obtido nos ensaios de viabilidade é robusto e consistente.

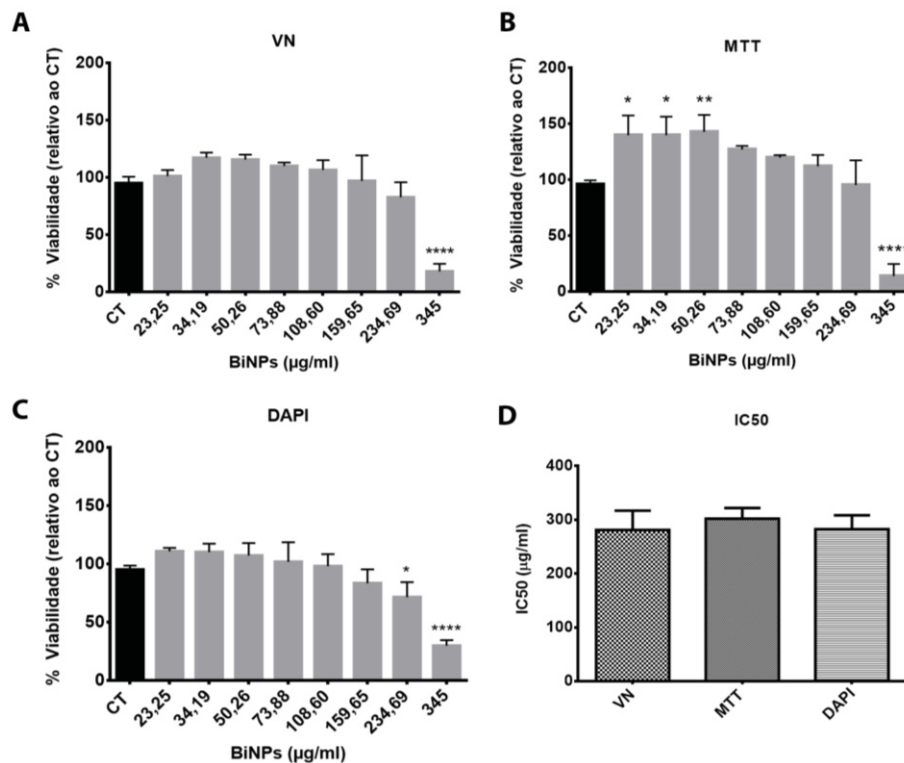


Figura 9: Avaliação da citotoxicidade de BiNPs em ADSCs. Foram realizados três experimentos independentes com três lotes distintos de BiNPs. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de

captação do vermelho neutro (VN) (A), MTT (B) e quantificação nuclear com DAPI (C). (D) Comparação entre os valores de concentração inibitória média (IC₅₀) das três metodologias. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão e foram analisados em relação ao controle (CT) (n = 3), exceto para o IC₅₀. A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao controle (CT): **p* <0,05; ***p* <0,01; ****p* <0,005; *****p* <0,001.

Tabela 2: Comparação entre os valores de IC₅₀ obtidos durante os ensaios de viabilidade celular relativa para as três metodologias empregadas.

REPLICATAS	IC ₅₀ (µg/ml)		
	VN	MTT	DAPI
Experimento 1	293,27	324,56	309,71
Experimento 2	309,51	294,71	257,86
Experimento 3	240,73	287,36	280,16
MÉDIA \pm DP	281,17 \pm 35,95	302,21 \pm 19,70	282,58 \pm 26,01

A partir destes resultados, foram determinadas as concentrações de BiNPs a serem empregadas nos ensaios posteriores. Para os ensaios de interação ultraestrutural por MET, proliferação celular e atividade mitocondrial, além de concentrações não citotóxicas, avaliou-se também a concentração de IC₅₀ relativa ao ensaio do MTT (302,21 µg/ml). Já para os ensaios de diferenciação celular, foram escolhidas somente concentrações de BiNPs que não reduziram a viabilidade celular de ADSCs (< 234,69 µg/ml).

4.3 EFEITOS ULTRAESTRUTURAIS DA INTERAÇÃO ENTRE A SOLUÇÃO COLOIDAL DE BiNPs E ADSCs

Para avaliar os efeitos da interação entre BiNPs e ADSCs a nível ultraestrutural, as células foram submetidas à análise morfológica por MET. Ao analisar as imagens, foi possível observar que as células não tratadas (grupo controle) (Fig. 10A) e as células tratadas com 34,19 µg/ml (Fig. 10B) ou 108,60 µg/ml (Fig. 10C) de BiNPs exibiram morfologias semelhantes. Nessas condições, a integridade da membrana plasmática e do núcleo celular foi mantida, podendo ser identificada também a presença de organelas citoplasmáticas íntegras, como a mitocôndria e o complexo de Golgi. Uma vez expostas a concentração de IC₅₀ (Fig. 10D), as células exibiram alta desorganização citoplasmática, o que é evidenciado pela presença de estruturas

celulares semelhantes a vacúolos no interior das células. Em conjunto, foi detectada a formação de figuras de mielina no citoplasma, sugerindo a ativação do processo autofágico das ADSCs. De maneira geral, a análise morfológica corroborou os dados obtidos nos ensaios de viabilidade celular relativa, sendo observados danos à ultraestrutura de ADSCs somente para a concentração citotóxica (IC_{50}) investigada. Ademais, não foi identificada a presença de BiNPs, caracterizadas como estruturas circulares eletrodensas (Fig. 8B), em nenhuma das condições testadas. Esses resultados sugerem que, nestas condições, as células não endocitaram as BiNPs e que as BiNPs não necessitam ser internalizadas para promoverem danos ultraestruturais em ADSCs.

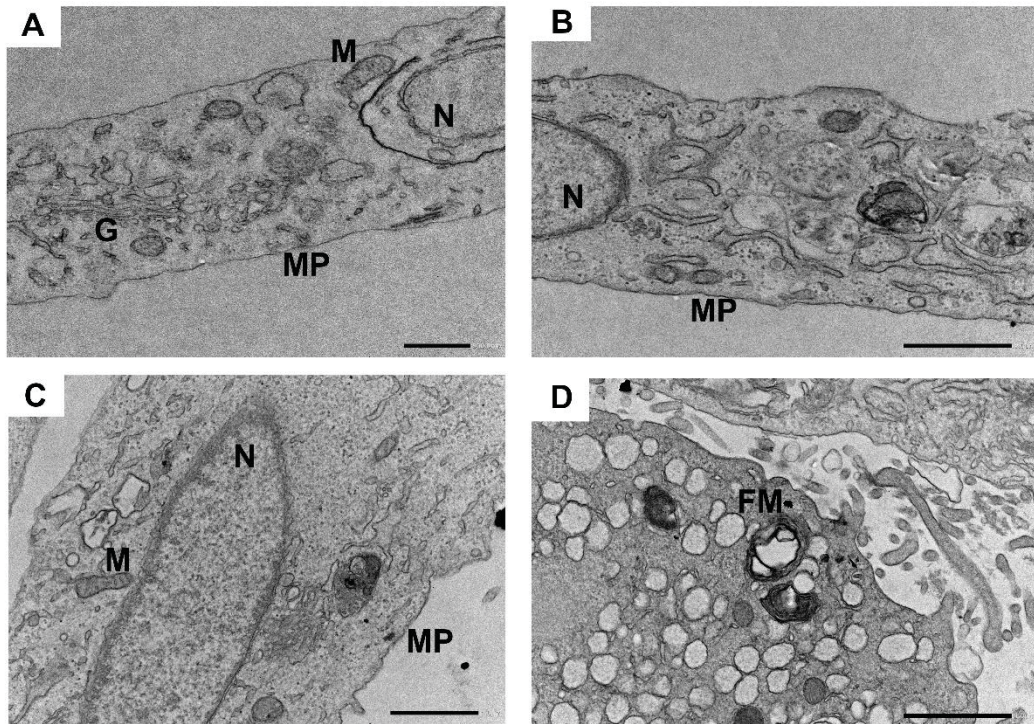


Figura 10: Análise ultraestrutural da interação entre ADSCs e BiNPs. As ADSCs foram expostas a BiNPs por 48 horas e em seguida submetidas à microscopia eletrônica de transmissão (MET). Imagens representativas do controle negativo (A) e de células expostas a 34,19 $\mu\text{g/ml}$ (B), 108,60 $\mu\text{g/ml}$ (C) e 302,24 $\mu\text{g/ml}$ de BiNPs. Barra de escala = 500 nm em (A) e 1 μm em (B), (C) e (D). N = núcleo; M = mitocôndria; G = complexo de golgi; MP = membrana plasmática; FM = figura de mielina. Escala = 500 nm em (A) e 1 μm em (B), (C) e (D).

4.4 TOXICIDADE MITOCONDRIAL DA SOLUÇÃO COLOIDAL DE BiNPs EM ADSCs

Tendo em vista o aumento expressivo na formação de cristais de formazan observado no ensaio do MTT, e que esse ensaio é baseado na atividade de

desidrogenases mitocondriais de células viáveis (VINKEN; BLAAUBOER, 2017), tornou-se interessante verificar a influência das BiNPs sobre a atividade mitocondrial de ADSCs. Dessa forma, a primeira etapa da avaliação da toxicidade mitocondrial de BiNPs em ADSCs consistiu na determinação do potencial de membrana mitocondrial através do corante lipofílico catiônico JC-10.

O JC-10 é capaz de penetrar seletivamente na mitocôndria, mudando reversivelmente de coloração de acordo com o potencial de membrana. Em mitocôndrias polarizadas, o JC-10 é retido na matriz mitocondrial formando agregados que emitem fluorescência vermelha (546 nm). Quando a mitocôndria entra em despolarização, o colapso no potencial de membrana impede a entrada do JC-10 na mitocôndria e, conseqüentemente, o corante permanece em sua coloração original verde (488 nm). Sendo assim, é possível determinar o potencial de membrana mitocondrial a partir da análise da razão da intensidade de fluorescência para cada coloração (546 nm – vermelho / 488 nm – verde). Conforme observado na figura 11A, identificou-se um aumento de $75,65 \pm 26,77\%$ e $48,16 \pm 14,98\%$ no potencial de membrana mitocondrial de células tratadas com 34,19 e 108,60 $\mu\text{g/ml}$ de BiNPs, respectivamente, em relação as células sem tratamento. O tratamento com CCCP (Fig. 11B) promoveu a despolarização das mitocôndrias de forma semelhante entre o grupo controle e ADSCs tratadas com BiNPs, confirmando a sensibilidade do JC-10 a alterações no potencial de membrana.

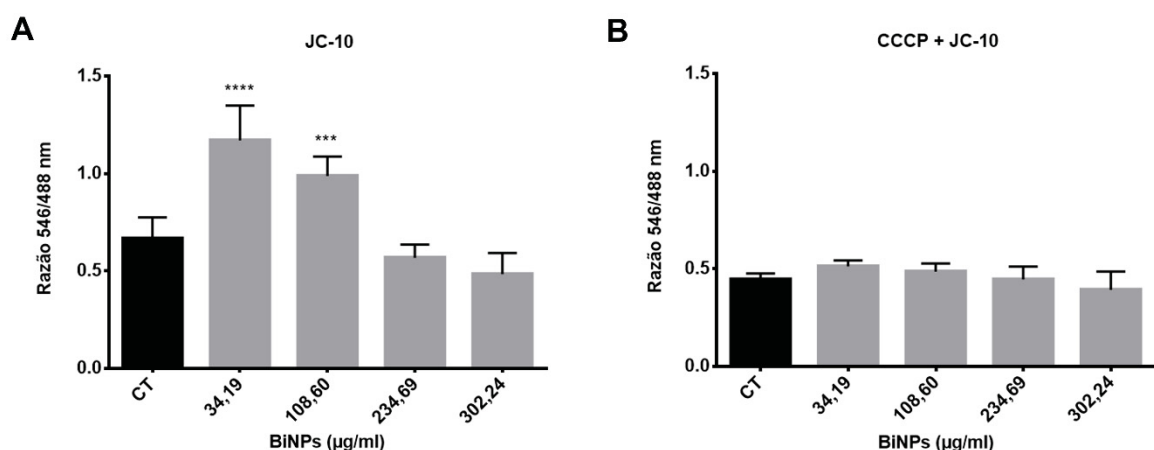


Figura 11: Avaliação da toxicidade mitocondrial de BiNPs pelo corante lipofílico catiônico JC-10. ADSCs tratadas com BiNPs (23,25 – 302,24 $\mu\text{g/ml}$) durante 48 horas foram observadas no aumento de 20X em sistema de *high content imaging* (Operetta®) e analisadas no software Harmony 4.8. A membrana mitocondrial polarizada é capaz de reter o JC-10, o que resulta na emissão da fluorescência vermelha (546 nm) pelo corante. Células com a membrana despolarizada, como é o caso do tratamento com CCCP, não conseguem reter o JC-10, que por sua vez emite fluorescência verde (488 nm). A razão média da intensidade de fluorescência do JC-10 (546/488 nm) foi determinada na ausência (A)

e na presença (B) do agente despolarizante CCCP. Células tratadas com DMSO 1% foram consideradas controle negativo (CT). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão e foram analisados em relação ao controle (CT) ($n = 6$). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao controle (CT): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$.

Na tentativa de confirmar os resultados observados com o JC-10, o potencial de membrana mitocondrial das ADSCs foi avaliado com o corante MitoTracker® Orange CMTMRos. Conforme observado na figura 12, foi detectada a presença de precipitados fluorescente de MitoTracker® Orange CMTMRos nos grupos tratados com as BiNPs inclusive nos espaços extracelulares, sugerindo uma possível interação das BiNPs com o corante. Como esperado, a análise quantitativa do número de células demonstrou redução somente na maior concentração de BiNPs (Fig. 13A). Em relação ao MitoTracker® Orange (Fig. 13B), o aumento na intensidade de fluorescência foi proporcional ao aumento das concentrações de BiNPs testadas e, conseqüentemente, a quantidade de precipitados fluorescentes detectados na análise visual. Dada a forte indicação de interação entre o corante e as BiNPs, não foi possível correlacionar os dados obtidos na marcação mitocondrial com MitoTracker® Orange com alterações no potencial de membrana mitocondrial e com os resultados provenientes do ensaio do JC-10.

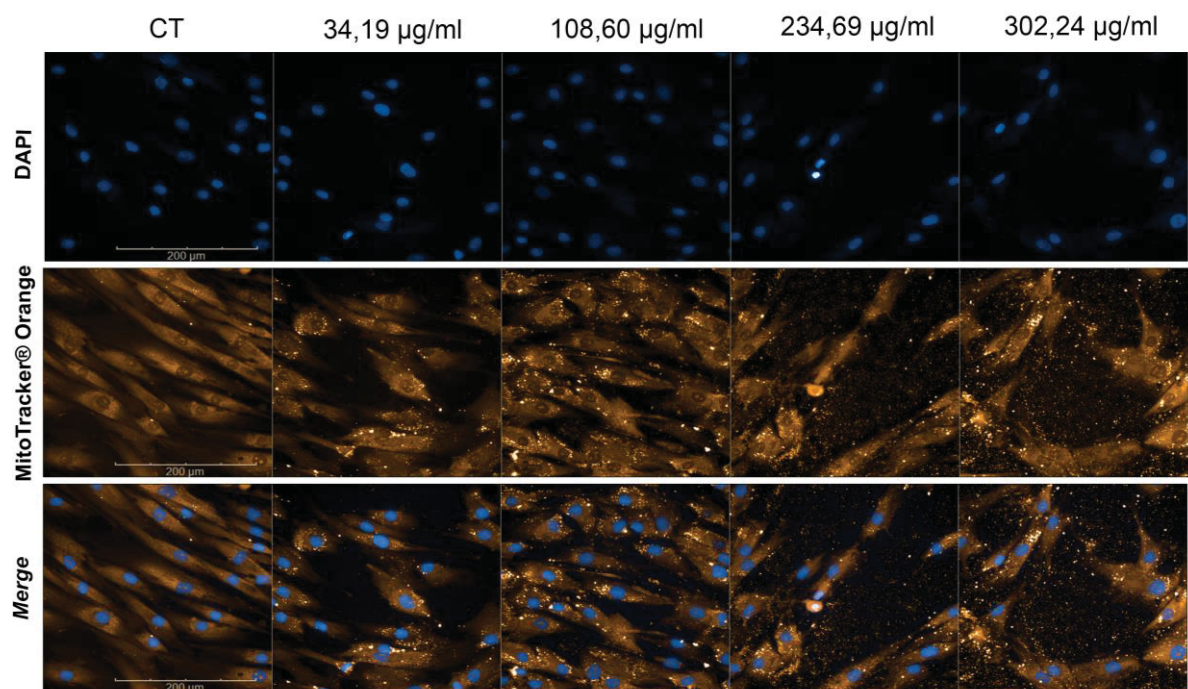


Figura 12: Imagem representativa de ADSCs marcadas com MitoTracker® Orange CMTMRos após o tratamento com BiNPs. As células foram expostas a BiNPs (34,19 - 302,24 µg/ml) durante 48 horas e

marcadas com MitoTracker® Orange CMTMRos, que cora mitocôndrias de acordo com o potencial de membrana mitocondrial. As imagens foram adquiridas por microscopia confocal na magnificação de 40X em sistema *high content imaging* (Operetta®). Escala = 200 µm.

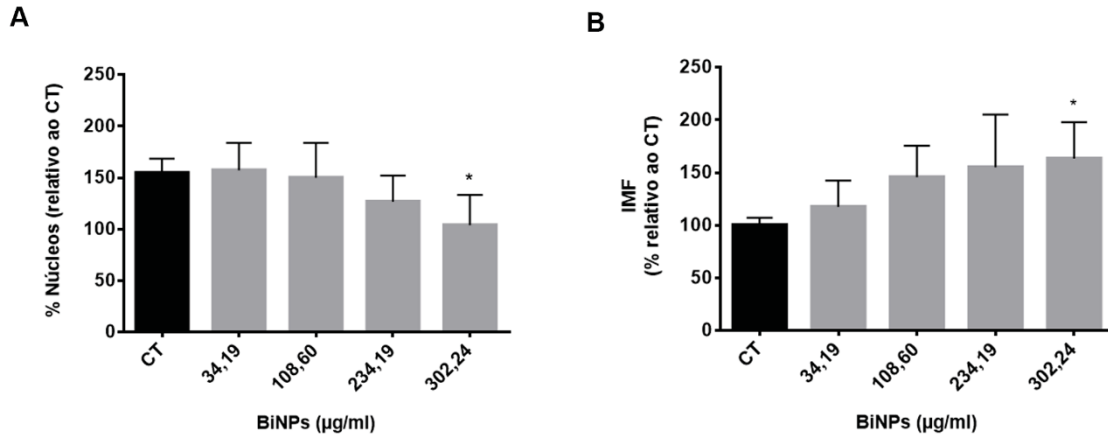


Figura 13: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial pelo corante MitoTracker® Orange CMTMRos. Após 48 horas de exposição à diferentes concentrações de BiNPs (34,19 - 302,24 µg/ml), as células foram marcadas com MitoTracker® Orange CMTMRos. As imagens foram adquiridas por microscopia confocal na magnificação de 40X em sistema *high content imaging* (Operetta®) e analisadas no software Harmony 4.8. A análise quantitativa foi realizada com base nos parâmetros de número de núcleos (A) e intensidade média de fluorescência (IMF) (C). Os dados estão expressos em média ± desvio padrão e foram analisados em relação ao controle (CT) (n = 6). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao controle (CT): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$.

Com base nos resultados obtidos no ensaio do JC-10, levantou-se a hipótese de que o aumento no potencial de membrana das mitocôndrias poderia estar associada com aumento na massa mitocondrial das ADSCs. Sendo assim, o corante MitoTracker® Green FM foi empregado para determinar a massa mitocondrial das ADSCs expostas à BiNPs por 48 horas (Fig. 14). A análise quantitativa das imagens obtidas por microscopia confocal demonstrou uma pequena redução na porcentagem de núcleos marcados com DAPI para as duas maiores concentrações de BiNPs testadas (Fig. 15A). Tendo em vista que o MitoTracker® Green FM cora mitocôndrias independentemente do potencial de membrana das mesmas, a intensidade média de fluorescência do corante pode ser diretamente relacionada com a massa mitocondrial das células. Como observado na figura 15B, as BiNPs reduziram a massa mitocondrial das ADSCs para $72,11 \pm 12,61\%$ e $61,00 \pm 10,36\%$ nas concentrações de 34,19 µg/ml e 108,60 µg/ml, respectivamente, em comparação as células não tratadas ($99,60 \pm 3,29\%$). Apesar da redução na porcentagem de núcleos, não foram detectadas diferenças significativas entre a massa mitocondrial de células tratadas com 234,69 e 302,24 µg/ml de BiNPs e o grupo controle. Em conjunto com o ensaio do JC-10, esses

dados sugerem que as BiNPs induzem hiperatividade mitocondrial sem promover aumento na massa mitocondrial de ADSCs.

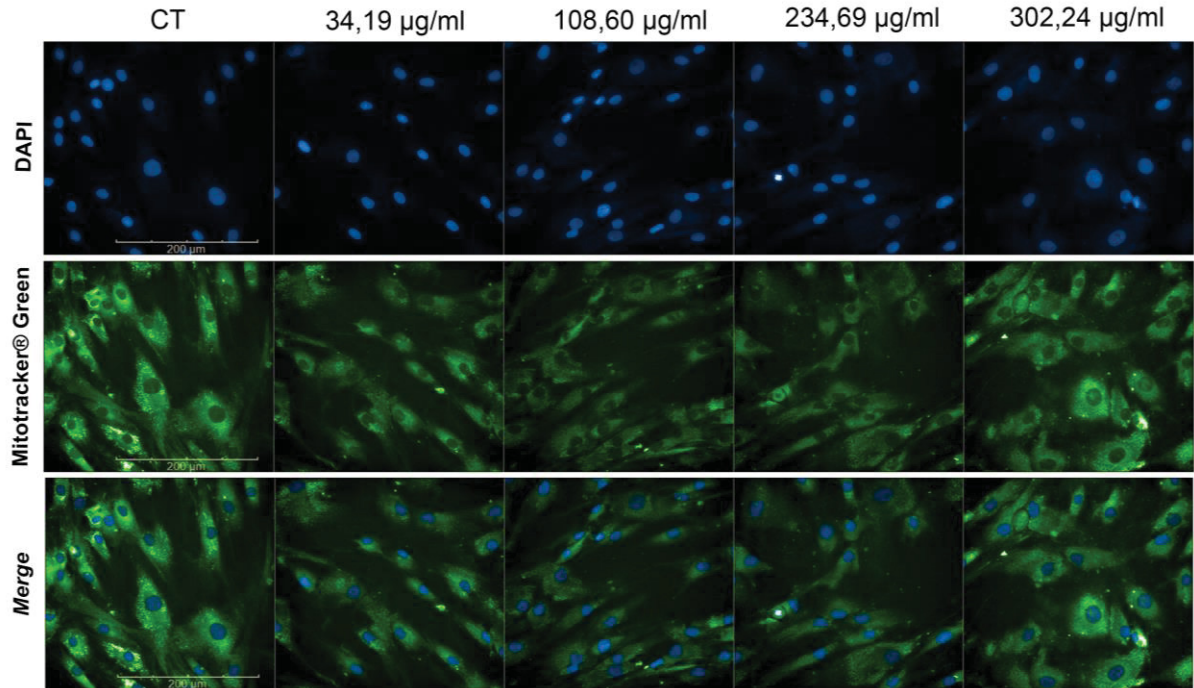


Figura 14: Imagem representativa de ADSCs marcadas com MitoTracker® Green FM após o tratamento com BiNPs. As ADSCs foram expostas a BiNPs (34,19 - 302,24 µg/ml) durante 48 horas e, em seguida, coradas com MitoTracker® Green FM para avaliação da massa mitocondrial. As imagens foram adquiridas por microscopia confocal na magnificação de 40X em sistema *high content imaging* (Operetta®). Escala = 200 µm.

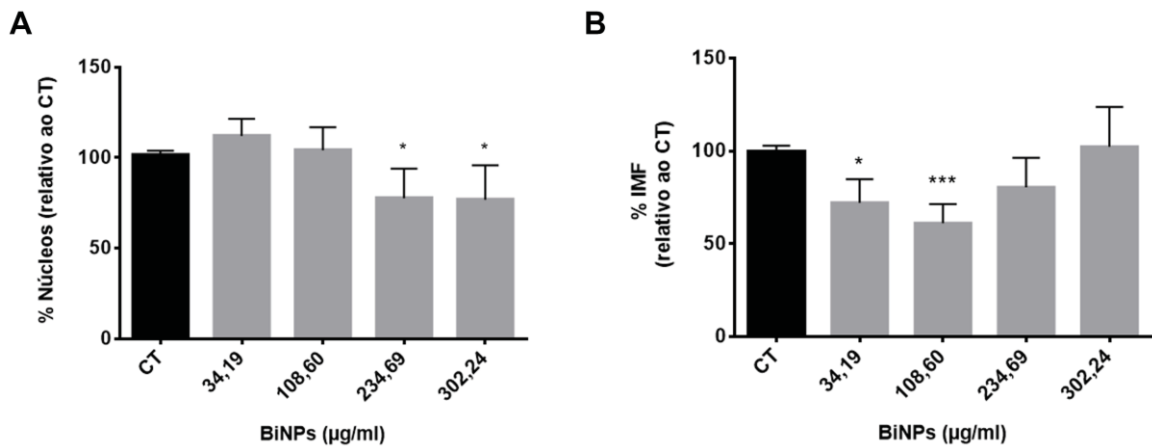


Figura 15: Determinação da massa mitocondrial pelo corante MitoTracker® Green FM. As ADSCs foram expostas a BiNPs (34,19 - 302,24 µg/ml) durante 48 horas. As células foram marcadas com MitoTracker® Green FM, que cora mitocôndrias independentemente do potencial de membrana mitocondrial. A análise quantitativa foi realizada baseada nos parâmetros de número de núcleos (B) e intensidade média de fluorescência (IMF) (C). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão e foram analisados em relação ao controle (CT) (n = 6). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao controle (CT): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$.

4.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SOLUÇÃO COLOIDAL DE BiNPs SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR DE ADSCs

Considerando que nos ensaios de viabilidade relativa uma das metodologias indicou um possível aumento de viabilidade sob concentrações não citotóxicas de BiNPs, buscou-se avaliar se as BiNPs poderiam estar interferindo com o processo de proliferação celular das ADSCs. Dessa forma, o potencial proliferativo de BiNPs em ADSCs foi determinado através das técnicas de imunomarcagem de Ki-67 e incorporação de EdU. Em relação ao ensaio de imunomarcagem da proteína nuclear Ki-67, conforme observado na figura 16, as BiNPs promoveram uma redução no número de núcleos nas maiores concentrações (Fig. 17A). A análise quantitativa das imagens confirmou que as BiNPs elevaram a porcentagem de células Ki-67⁺ para $80,39 \pm 4,23\%$ na concentração de $108,60 \mu\text{g/ml}$, enquanto as células do controle exibiram $43,48 \pm 20,30\%$ de células positivas para a marcação (Fig. 17B). Para as concentrações de $50,26$ e $234,69 \mu\text{g/ml}$ de BiNPs, a porcentagem de células Ki-67⁺ foi de $69,71 \pm 9,55\%$ e $70,01 \pm 14,50\%$, respectivamente (Fig. 17B).

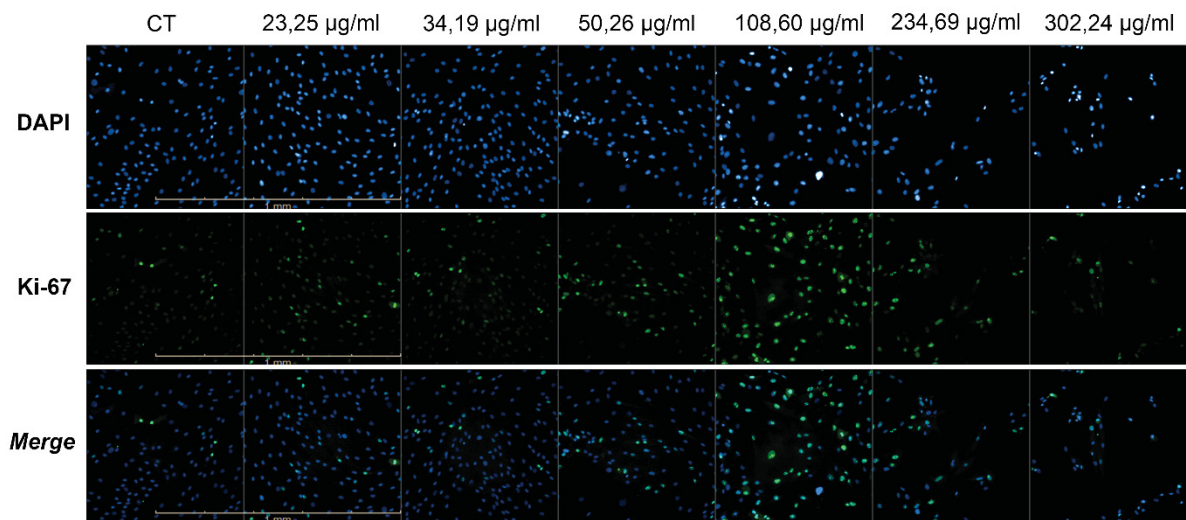


Figura 16: Imagem representativa da imunomarcagem da proteína nuclear Ki-67. As células foram tratadas com BiNPs por 48 horas e marcadas para Ki-67 (verde) em seguida. Os núcleos foram evidenciados com DAPI (azul). As imagens foram adquiridas no aumento de 20X em sistema de *high content imaging* (Operetta®) e analisadas no software Harmony 4.8. Escala = 2 mm.

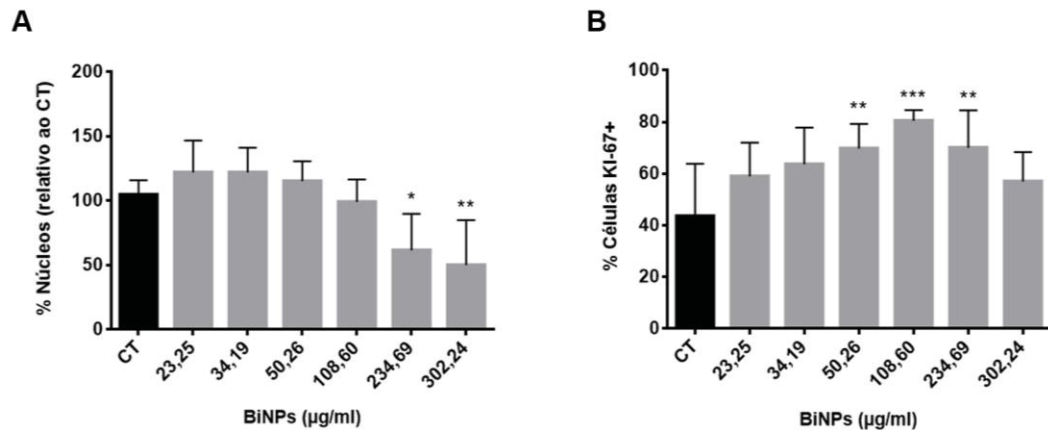


Figura 17: Efeito de BiNPs sobre a proliferação celular de acordo com a imunomarcação da proteína nuclear Ki-67. A marcação da proteína Ki-67 foi realizada após 48 horas de exposição à BiNPs. As imagens foram adquiridas no aumento de 20X em sistema de *high content imaging* (Operetta®) e analisadas no software Harmony 4.8. (A) Quantificação dos núcleos marcados com DAPI. (B) Análise quantitativa das células positivas para marcação de Ki-67. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão e foram analisados em relação ao controle (CT) ($n = 6$). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao controle (CT): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$.

Quanto ao ensaio de incorporação do análogo de timina EdU (Fig. 18), conforme esperado, as duas maiores concentrações reduziram o número de núcleos (Fig. 19A). De maneira semelhante ao ensaio de marcação de Ki-67, as células tratadas com BiNPs por 48 horas apresentaram alta prevalência de células positivas para marcação com EdU (EdU⁺) (Fig.18 - EdU). Quantitativamente, as BiNPs aumentaram a porcentagem de células EdU⁺ para $21,54 \pm 5,44\%$ na concentração de $108,60 \mu\text{g/ml}$ em relação ao grupo controle ($11,97 \pm 1,09\%$) (Fig. 19B). Para as concentrações de $23,25$ e $50,26 \mu\text{g/ml}$ de BiNPs, a incorporação de EdU ocorreu em $19,37 \pm 3,63\%$ e $20,71 \pm 4,11\%$ das células, respectivamente. Para as duas metodologias empregadas, os resultados indicam que BiNPs em concentrações não citotóxicas possuem efeito estimulatório sobre a proliferação celular de ADSCs.

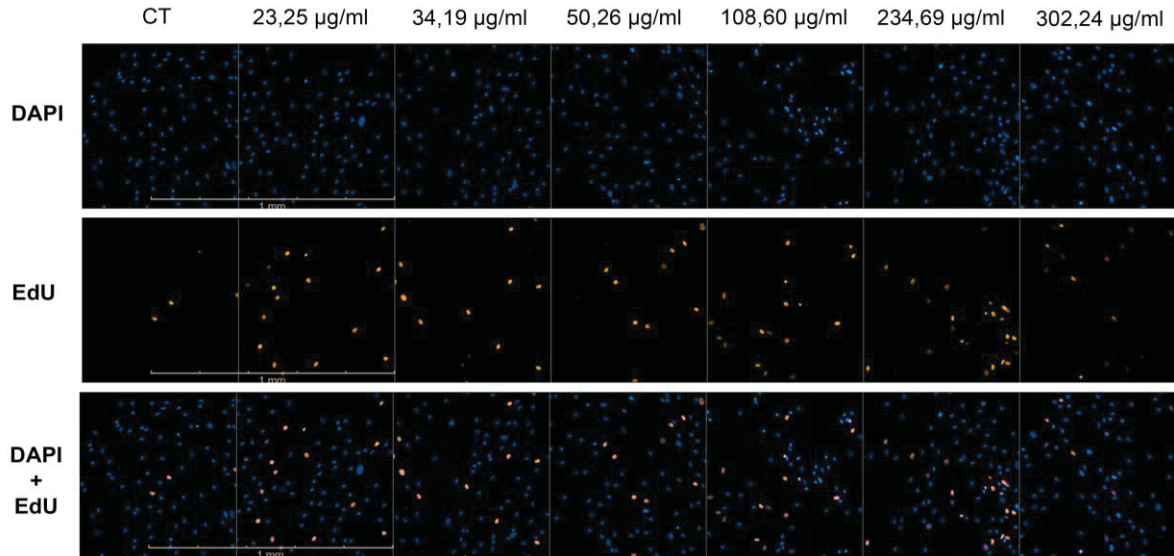


Figura 18: Imagem representativa das células positivas para marcação com EdU. As células foram tratadas com BiNPs (23,25 – 302,24 µg/ml) durante 48 horas e marcadas com o análogo de timina EdU (laranja), ao passo que os núcleos celulares foram evidenciados com DAPI (azul). As imagens foram adquiridas no aumento de 20X em sistema de *high content imaging* (Operetta®) e analisadas no software Harmony 4.8. Escala = 2 mm.

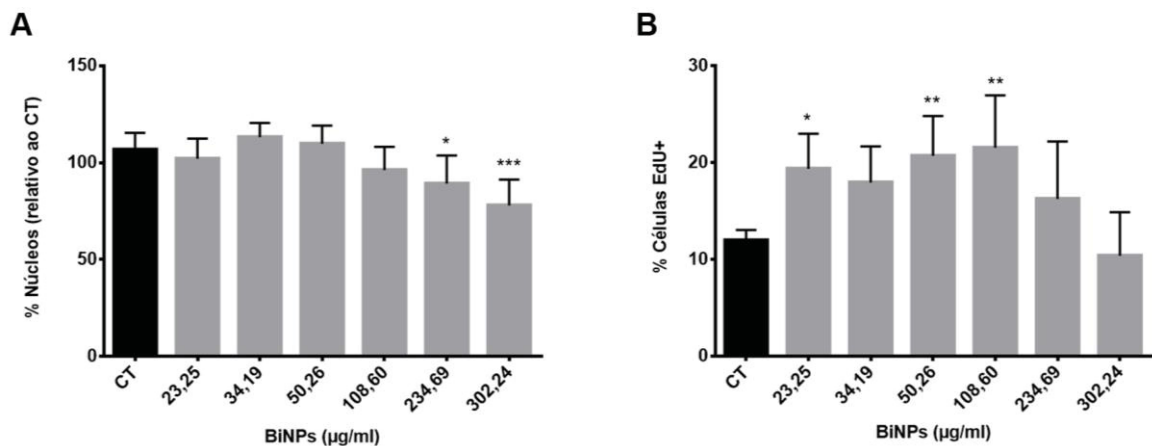


Figura 19: Avaliação da proliferação celular através do ensaio de incorporação do EdU. A proliferação de ADSCs foi mensurada com o análogo de timina EdU após 48 horas de exposição à diferentes concentrações de BiNPs (23,25 – 302,24 µg/ml). As imagens foram adquiridas no aumento de 20X em sistema de *high content imaging* (Operetta®) e analisadas no software Harmony 4.8. (A) Análise quantitativa dos núcleos marcados com DAPI. (B) Análise quantitativa das células positivas para marcação com EdU. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão e foram analisados em relação ao controle (CT) (n = 6). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao controle (CT): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$.

4.6 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SOLUÇÃO COLOIDAL DE BiNPs SOBRE A DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA DE ADSCs

Com base nos ensaios de viabilidade celular relativa, foram determinadas concentrações não citotóxicas de BiNPs para serem avaliadas durante a adipogênese. Entretanto, uma vez que o protocolo de diferenciação adipogênica tem duração de 14 dias, buscou-se inicialmente avaliar a citotoxicidade das concentrações selecionadas sobre ADSCs indiferenciadas durante esse período através da quantificação nuclear com DAPI. Para a exposição única (Fig. 20A), a porcentagem de núcleos foi reduzida somente na maior concentração testada (200 µg/ml). Já para a exposição repetida (Fig. 20B), a redução no número de núcleos foi observada a partir da concentração de 43,26 µg/ml, onde a viabilidade decaiu para $62,42 \pm 26,53\%$.

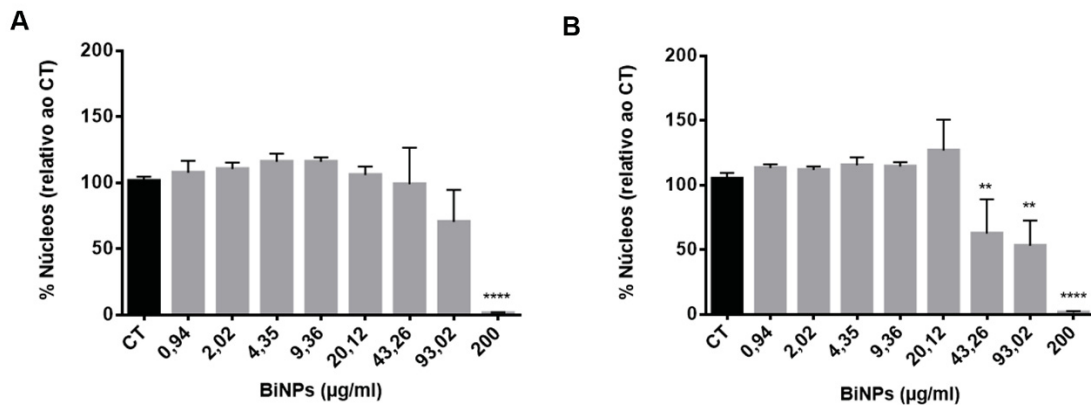


Figura 20: Influência da exposição prolongada a BiNPs (14 dias) sobre a viabilidade celular relativa de ADSCs. BiNPs (0,94 – 200 µg/ml) foram aplicadas as ADSCs no dia 0 do protocolo. O meio de cultivo foi renovado a cada 3 – 4 dias sem (exposição única) ou com adição (exposição repetida) de BiNPs. A marcação nuclear com DAPI para determinação indireta da viabilidade foi realizada no décimo quarto dia do protocolo. As imagens foram adquiridas no aumento de 20X em sistema de *high content imaging* (Operetta®) e analisadas no software Harmony 4.8. (A) Análise quantitativa da porcentagem de núcleos para a exposição única à BiNPs. (B) Análise quantitativa da porcentagem de núcleos para a exposição repetida à BiNPs. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão e foram analisados em relação ao controle (CT) ($n = 3$). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett. Os asteriscos representam o nível de significância * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$.

A influência das BiNPs sobre a diferenciação adipogênica foi igualmente avaliada por meio dos protocolos de exposição única e exposição repetida. Após 14 dias de indução, gotículas intracelulares de gordura puderam ser observadas no citoplasma de células induzidas à diferenciação quando comparadas com o controle não induzido, confirmando a eficiência do meio de diferenciação (Fig. 21).

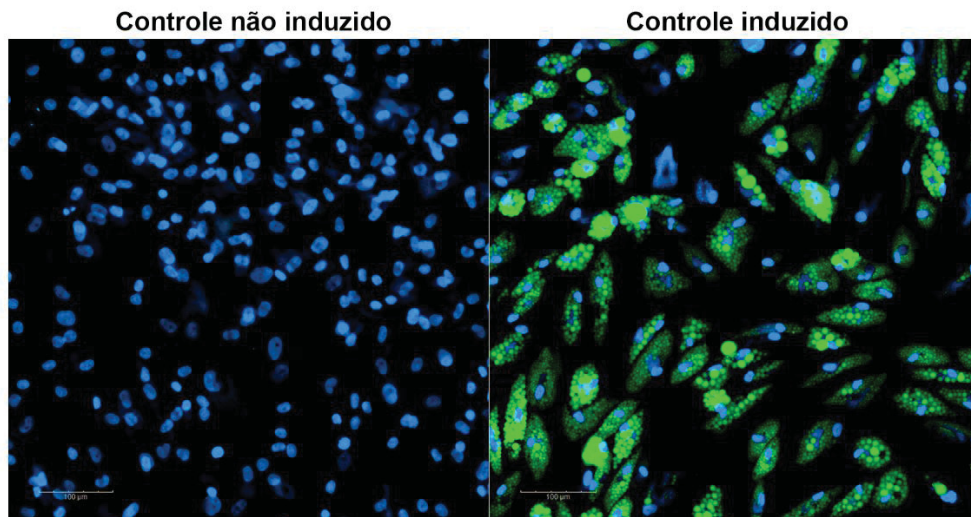


Figura 21: Imagem representativa de ADSCs não induzidas e induzidas à diferenciação adipogênica durante 14 dias. As gotículas lipídicas foram coradas com vermelho Nilo (verde) e os núcleos evidenciados com DAPI (azul). As imagens foram adquiridas em aumento de 20X em sistema de *high content imaging* (Operetta®). Escala = 100 µm.

Como observado na figura 22, a inclusão de gotículas lipídicas foi reduzida após exposição única as BiNPs. As análises quantitativas para determinar a eficiência de diferenciação foram realizadas em sistema *high content imaging* (Fig. 23A-C) e leitor de placas (Fig. 23D). Durante a exposição única, as BiNPs reduziram o número de núcleos somente na concentração de 200 µg/ml (Fig. 23A). Entretanto, a inibição da adipogênese pôde ser detectada em concentrações mais baixas de BiNPs. A área de diferenciação (Fig. 23B), que consiste na área total de diferenciação marcada com vermelho Nilo, caiu para $52,96 \pm 21,95\%$ já na concentração de 43,26 µg/ml. Para as concentrações de 93,02 µg/ml e 200 µg/ml a inibição da adipogênese foi ainda mais marcante, sendo a área de diferenciação reduzida para $17,23 \pm 4,14\%$ e $2,12 \pm 1,81\%$, respectivamente. Foi identificada também uma redução gradual no percentual de diferenciação celular (área de diferenciação normalizada pelo número de núcleos) (Fig. 23C) a partir da concentração de 43,26 µg/ml ($51,52 \pm 18,49\%$). A quantificação da intensidade média de fluorescência adquirida em leitor de placas (Fig. 23D) confirmou o decréscimo da diferenciação adipogênica, sendo observado efeito inibitório nas concentrações de 93,02 µg/ml ($31,55 \pm 19,46\%$) e 200 µg/ml ($5,25 \pm 3,64\%$).

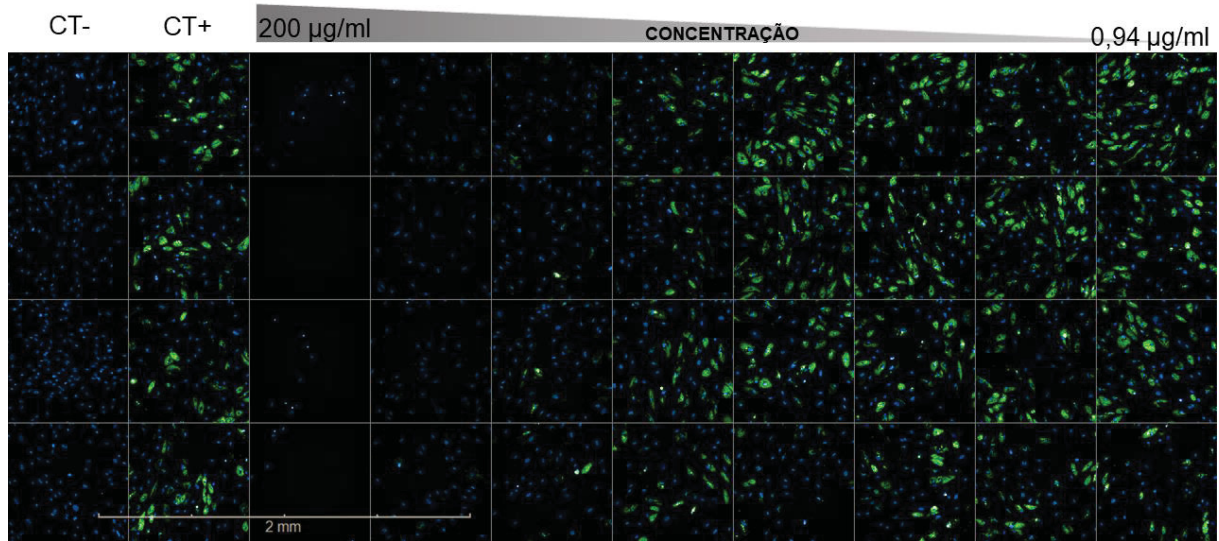


Figura 22: Análise visual dos efeitos da exposição única à BiNPs na diferenciação adipogênica de ADSCs. BiNPs (0,94-200 µg/ml) foram aplicadas as ADSCs no dia 0 do protocolo de indução adipogênica. O meio de indução foi renovado a cada 3 – 4 dias sem adição extra de BiNPs. As gotículas intracelulares de gordura foram marcadas com o corante vermelho nilo (verde) e os núcleos corados com DAPI (azul). As imagens foram obtidas no aumento de 20X em *high content imaging* (Operetta®). Escala = 2 mm.

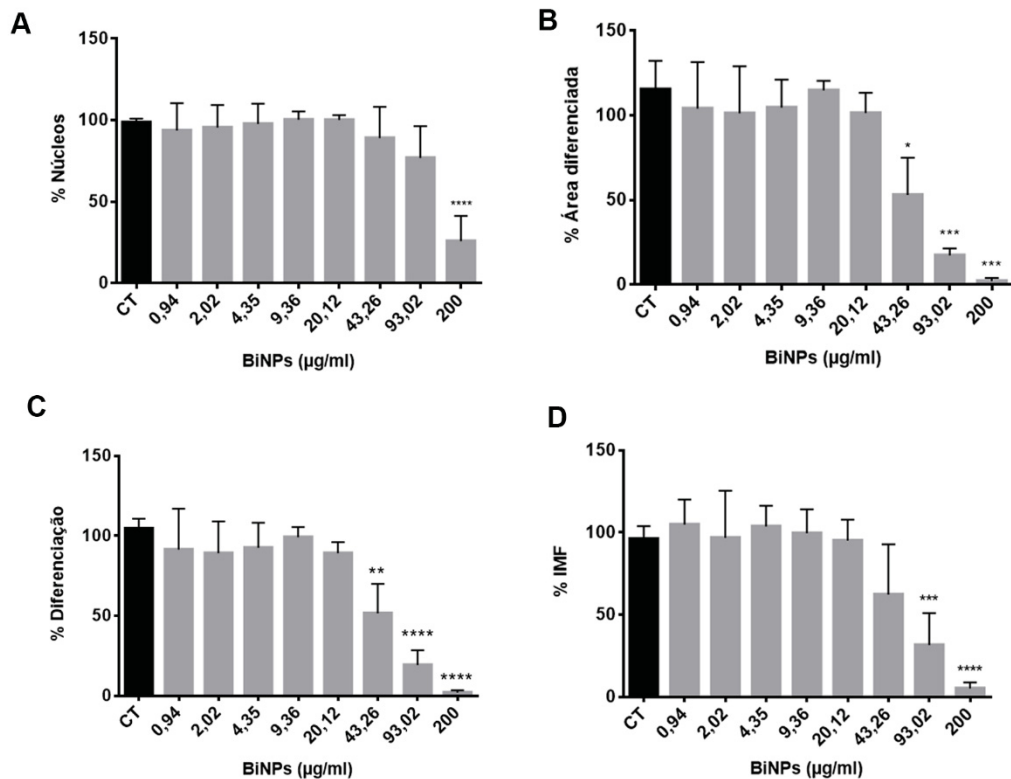


Figura 23: Quantificação da eficiência de diferenciação adipogênica após exposição única à BiNPs. Após 14 dias de indução seguindo o protocolo de exposição única, ADSCs expostas a oito concentrações de BiNPs (0,94 - 200 µg/ml) foram coradas com vermelho nilo e DAPI. O número de núcleos (A), a área total (µm²) de diferenciação marcada com vermelho Nilo (B) e o percentual de diferenciação (µm²/número de núcleos) (C) foram quantificadas em *high content imaging* (Operetta®). A intensidade média de fluorescência (D) foi quantificada em leitor de placas. Os dados estão expressos

em média \pm desvio padrão ($n = 3$). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao controle (CT): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$.

Em relação aos efeitos da exposição repetida de BiNPs sobre a diferenciação adipogênica (Fig. 24), a análise quantitativa por *high content imaging* indicou redução na porcentagem de núcleos a partir da concentração de 93,02 $\mu\text{g/ml}$ ($12,41 \pm 9,56\%$) (Fig. 25A). Em contraste com a exposição única, a inibição gradual da adipogênese no protocolo de exposição repetida teve início na concentração de 20,12 $\mu\text{g/ml}$, onde a área de diferenciação celular (Fig. 25B) decaiu para $61,01 \pm 25,26\%$ e o percentual de diferenciação (Fig. 25C) para $54,88 \pm 19,35\%$ em relação ao grupo controle. Apesar disso, a inibição na adipogênese foi mais acentuada na concentração de 43,26 $\mu\text{g/ml}$, sendo a área e o percentual de diferenciação celular reduzidos para $11,74 \pm 8,75\%$ e $9,09 \pm 6,38\%$, respectivamente. Conforme evidenciado na figura 25D, o tratamento repetido com 20,12 $\mu\text{g/ml}$ de BiNPs reduziu a intensidade de fluorescência para $62,41 \pm 22,26\%$, exibindo alta concordância com a redução da área de diferenciação previamente registrada para a mesma concentração.

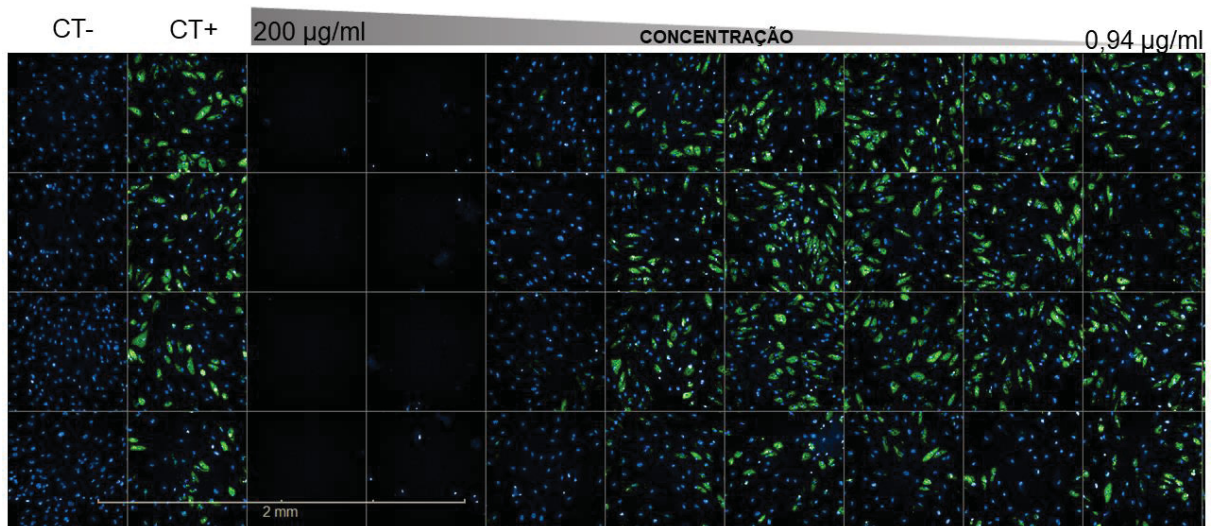


Figura 24: Efeito inibitório da exposição repetida à BiNPs sobre a diferenciação adipogênica de ADSCs. Nesse protocolo, BiNPs foram adicionadas às ADSCs no dia 0 do protocolo de indução adipogênica e foram renovadas a cada 3-4 dias, juntamente com o meio de indução. Após 14 dias de ensaio, as inclusões lipídicas no citoplasma foram evidenciadas com o corante vermelho Nilo (verde) e os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). As imagens foram obtidas no aumento de 20X em *high content imaging* (Operetta®). Escala = 2 mm.

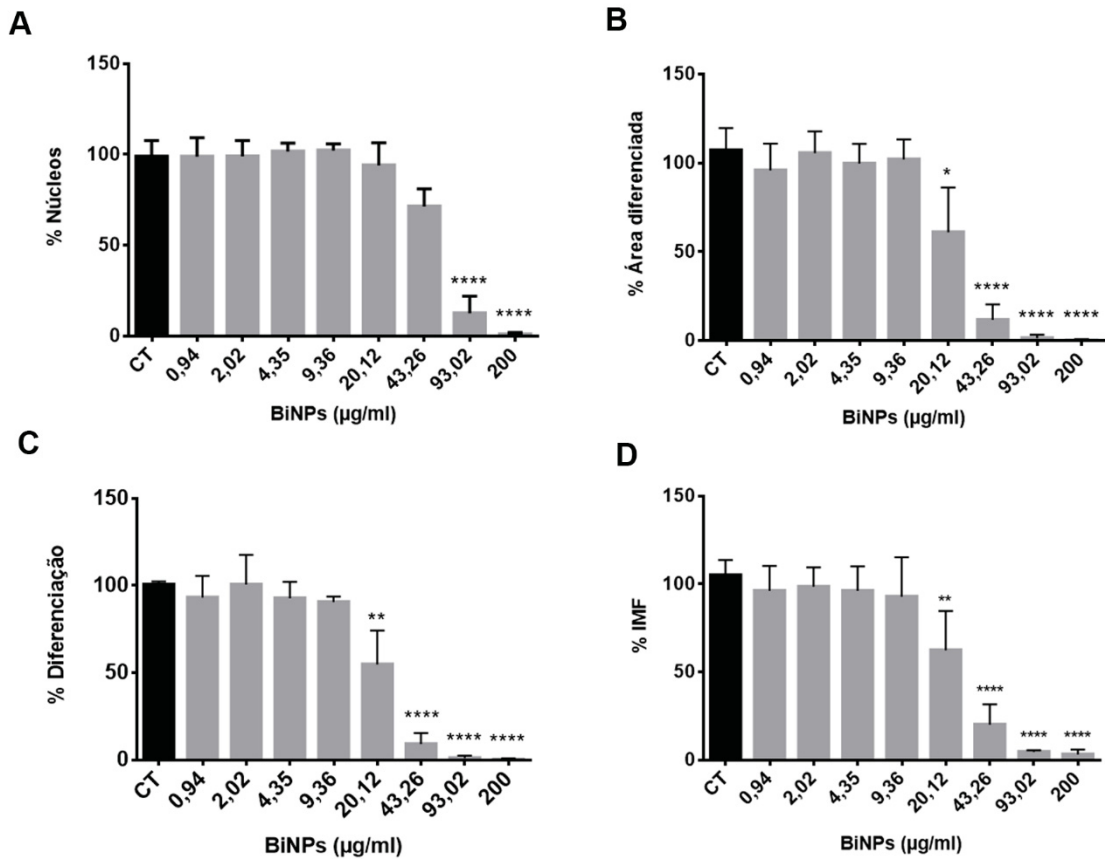


Figura 25: Exposição repetida as BiNPs interferem com a diferenciação adipogênica de ADSCs. BiNPs (0,94-200 µg/ml) foram aplicadas as ADSCs no dia 0 do protocolo de indução adipogênica. O meio de indução foi renovado a cada 3-4 dias, com adição de BiNPs a cada troca de meio. A eficiência de diferenciação foi avaliada no décimo quarto dia após a indução. O número de núcleos (A), a área total (μm^2) de diferenciação marcada com vermelho Nilo (B) e o percentual de diferenciação ($\mu\text{m}^2/\text{número}$ de núcleos) (C) foram quantificadas em *high content imaging* (Operetta®). A intensidade média de fluorescência (D) foi quantificada em leitor de placas. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão ($n = 3$). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao controle (CT): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$.

Com o intuito de confirmar o efeito inibitório das BiNPs sobre a diferenciação adipogênica à nível molecular, a expressão de mRNA de genes específicos da via adipogênica foi determinada. De acordo com os resultados da RT-qPCR, uma única exposição à 43,26 µg/ml de BiNPs reduziu em $69,97 \pm 17,63\%$, $75,65 \pm 13,89\%$ e $77,63 \pm 8,31\%$ os níveis de expressão dos marcadores PPAR γ , C/EBP α e FABP4, respectivamente (Fig. 26A – C). Não foram detectadas alterações significativas na expressão dos marcadores para as outras duas concentrações testadas (20,12 e 9,36 µg/ml), confirmando os resultados previamente obtidos para inibição da adipogênese após exposição única a BiNPs (Fig. 23).

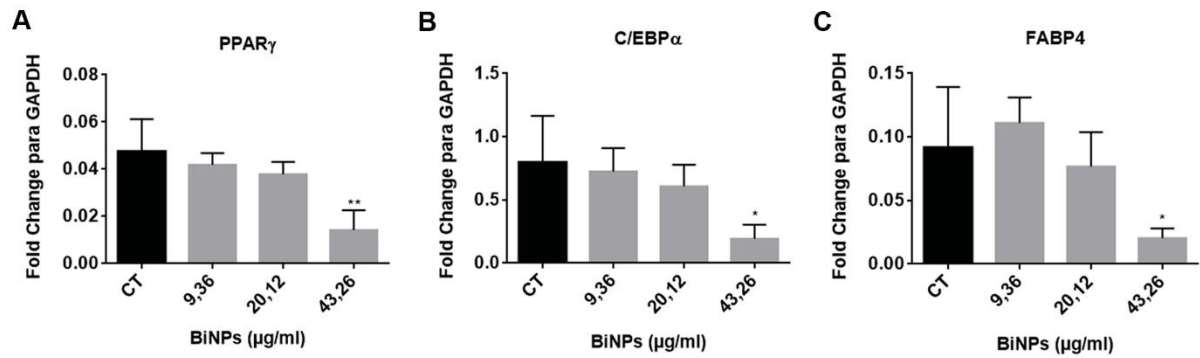


Figura 26: Expressão relativa de genes marcadores da diferenciação adipogênica após exposição única as BiNPs. Após 14 dias de exposição (9,36 – 43,26 $\mu\text{g/ml}$), a expressão de mRNA para cada gene foi determinada por RT-qPCR e analisada pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Expressão relativa dos genes PPAR γ (A), C/EBP α (B) e FABP4 (C). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão (n = 3). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao controle (CT): *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,005; ****p < 0,001.

Em contraste, ADSCs expostas a doses repetidas de BiNPs demonstraram diminuição na expressão de PPAR γ ($73,22 \pm 6,39\%$) e C/EBP α ($74,00 \pm 16,18\%$) a partir da concentração de 20,12 $\mu\text{g/ml}$, ao passo que para o FABP4 os níveis de expressão de mRNA decaíram somente no tratamento com 43,26 $\mu\text{g/ml}$ de BiNPs ($99,34 \pm 0,53\%$) (Fig. 27A – C). Não houve diferença significativa para nenhum dos marcadores na concentração de 9,36 $\mu\text{g/ml}$, exibindo alta concordância com o padrão de inibição da diferenciação adipogênica previamente demonstrado (Fig. 25). Em conjunto, esses dados sugerem que concentrações não citotóxicas de BiNPs afetam negativamente a diferenciação adipogênica de ADSCs.

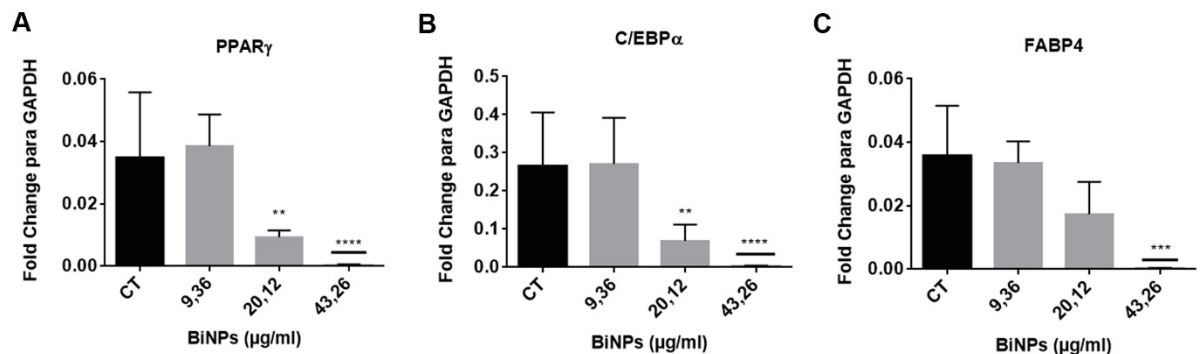


Figura 27: Efeitos da exposição repetida à BiNPs sobre a expressão relativa de genes marcadores da diferenciação adipogênica. Após 14 dias de indução adipogênica e tratamento repetido com BiNPs (9,36 – 43,26 $\mu\text{g/ml}$), a expressão de mRNA para cada gene foi determinada por RT-qPCR e analisada pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão e foram analisados em relação ao controle (CT) (n = 3). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao controle (CT): *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,005; ****p < 0,001

4.7 EFEITOS DA SOLUÇÃO COLOIDAL DE BiNPs SOBRE A DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE ADSCs

Visando avaliar os efeitos de BiNPs sobre a diferenciação osteogênica de ADSCs, buscou-se primeiramente avaliar a citotoxicidade de BiNPs após 21 dias de exposição única ou repetida à ADSCs indiferenciadas. Tanto para o protocolo de exposição única (Fig. 28A) quanto para o protocolo de exposição repetida (Fig. 28B), foi possível observar uma redução significativa na porcentagem de núcleos marcados com DAPI a partir da concentração de 93,02 $\mu\text{g/ml}$.

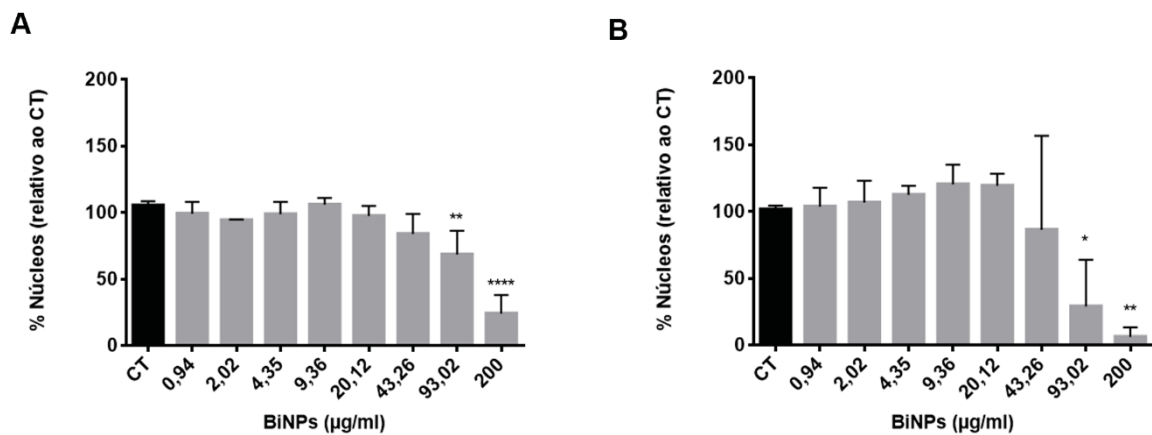


Figura 28: Efeito de BiNPs sobre a viabilidade de ADSCs após 21 dias em cultura. ADSCs receberam oito concentrações de BiNPs (0,94 – 200 $\mu\text{g/ml}$) no dia 0 do protocolo, sendo o meio de cultura renovado a cada 3 – 4 dias sem adição (exposição única) ou com adição extra (exposição repetida) de BiNPs. No vigésimo primeiro dia de experimento, os núcleos foram corados com DAPI para quantificação do número de células. As imagens foram adquiridas no aumento de 20X em sistema de *high content imaging* (Operetta®) e analisadas no software Harmony 4.8. (A) Análise quantitativa do número de núcleos para a exposição única à BiNPs. (B) Análise quantitativa do número de núcleos para a exposição repetida à BiNPs. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão e foram analisados em relação ao controle (CT) ($n = 3$). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao controle (CT): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$.

Verificada a viabilidade celular frente à exposição às concentrações de interesse, buscou-se avaliar o efeito da exposição única e repetida de BiNPs sobre a diferenciação osteogênica de ADSCs. Conforme demonstrado na figura 29, a deposição de matriz mineralizada pôde ser observada em células induzidas a osteogênese por 21 dias quando comparadas com o controle não induzido, confirmando a eficiência do protocolo de diferenciação celular.

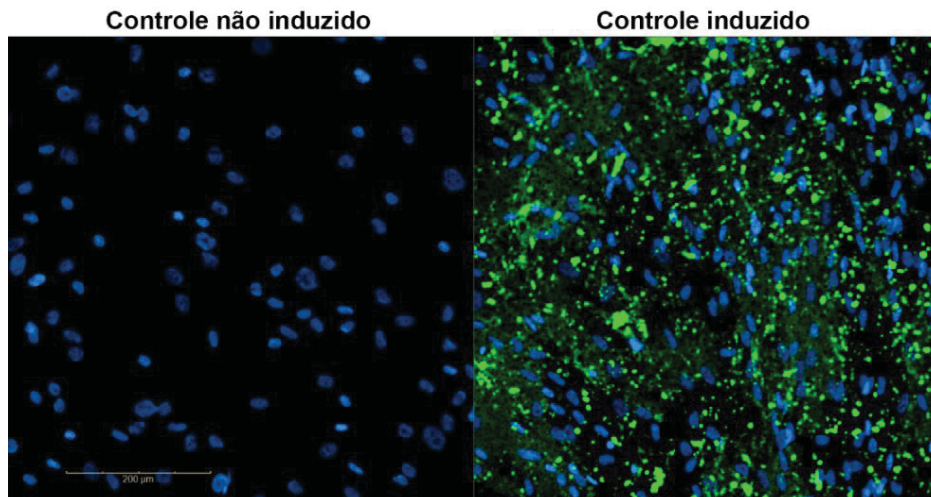


Figura 29: Imagem representativa de ADSCs não induzidas e induzidas a diferenciação osteogênica durante 21 dias. A matriz mineralizada foi marcada com o kit OsteoImage® (verde) e os núcleos foram evidenciados com DAPI (azul). As imagens foram adquiridas no aumento de 20X em sistema de *high content imaging* (Operetta®). Escala = 200 µm.

Após exposição única as BiNPs, observou-se um decréscimo na deposição de matriz mineralizada e no número de núcleos para as maiores concentrações testadas em relação ao grupo controle (Fig. 30). Em concordância com o ensaio de citotoxicidade durante 21 dias, a porcentagem de núcleos foi reduzida para $49,36 \pm 30,09$ e $10,70 \pm 10,77\%$ nas concentrações de 93,02 e 200 µg/ml, respectivamente, durante a osteogênese (Fig. 31A). A inibição da diferenciação osteogênica pôde ser observada a partir da concentração de 9,36 µg/ml, onde a área de diferenciação celular decaiu para $61,70 \pm 17,40\%$ (Fig. 31B). Entretanto, não houve diferença significativa no percentual total de diferenciação para nenhum dos tratamentos com BiNPs (Fig. 31C).

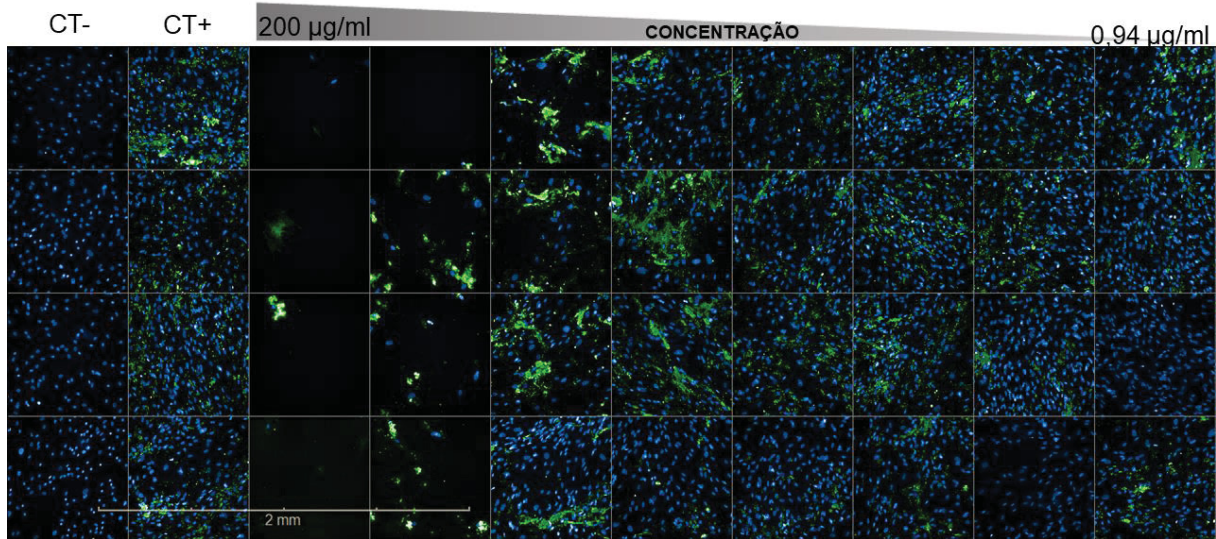


Figura 30: Efeito da exposição única de BiNPs sobre a diferenciação osteogênica de ADSCs. BiNPs (0,94 - 200 µg/ml) foram aplicadas nas ADSCs no dia 0 do protocolo de indução osteogênica, sendo o meio de indução renovado a cada 3 – 4 dias sem renovação de BiNPs. O depósito de matriz extracelular foi evidenciado com o kit OsteoImage® (verde) e os núcleos corados com DAPI (azul). As imagens foram obtidas no aumento de 20X em *high content imaging* (Operetta®). Barra de escala = 2 mm.

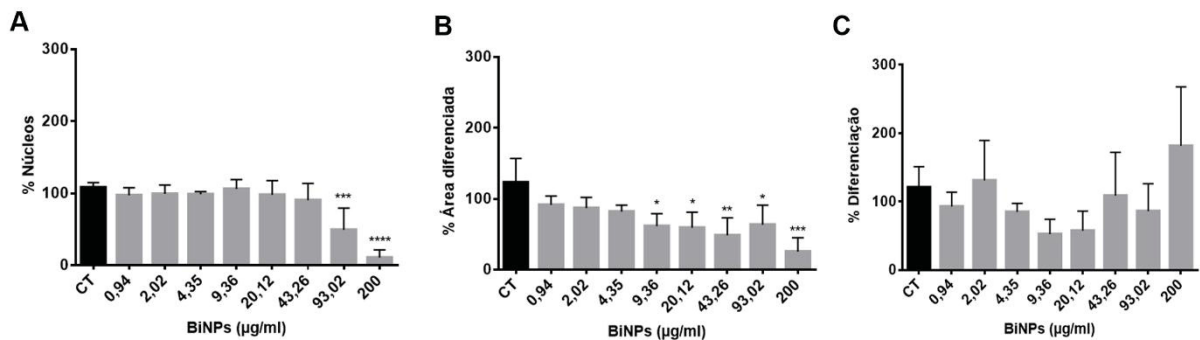


Figura 31: Quantificação da eficiência de diferenciação osteogênica de ADSCs após exposição única a BiNPs. A eficiência de diferenciação foi avaliada no vigésimo primeiro dia de diferenciação, após exposição única à BiNPs na faixa de concentração de 0,94 - 200 µg/ml. A análise quantitativa realizada em sistema *high content imaging* (Operetta®) foi expressa em número de núcleos (A), área de diferenciação (µm²) marcada com OsteoImage® (B) e percentual de diferenciação (µm²/número de núcleos) (C). Os dados estão expressos em média ± desvio padrão e foram analisados em relação ao controle (CT) (n = 4). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao controle (CT): *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,005; ****p < 0,001.

Em relação ao tratamento repetido com BiNPs, a análise visual (Fig. 32) também indicou inibição no processo de diferenciação osteogênica de ADSCs. Conforme observado na figura 33A, a redução no número de núcleos em relação ao controle ($101,80 \pm 2,50\%$) foi dose-dependente, tendo início na concentração de 43,26 µg/ml ($19,98 \pm 13,17\%$). Em contrapartida, a inibição da área total de diferenciação (Fig. 33B) pôde ser observada na concentração de 4,35 µg/ml ($60,03 \pm 14,78\%$),

sendo o efeito inibitório das BiNPs mais acentuado a partir da concentração de 43,26 $\mu\text{g/ml}$ ($37,91 \pm 14,75\%$). O percentual de diferenciação (Fig. 33C), por sua vez, só apresentou redução significativa para os tratamentos com 93,02 e 200 $\mu\text{g/ml}$ de BiNPs.

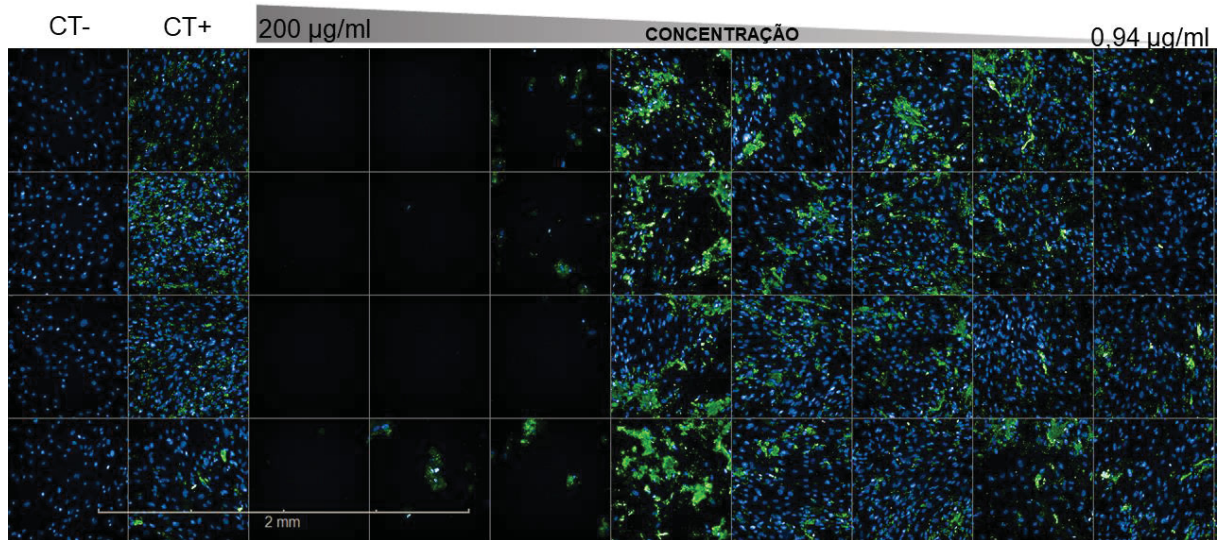


Figura 32: Efeitos da exposição repetida à BiNPs sobre a diferenciação osteogênica de BiNPs. Células expostas a oito concentração de BiNPs (0,94 - 200 $\mu\text{g/ml}$) no dia 0 do protocolo foram induzidas a diferenciação osteogênica, sendo o meio de indução com BiNPs renovado a cada 3 – 4. No vigésimo primeiro dia de experimento, o depósito de matriz extracelular foi evidenciado o kit Osteolmage® (verde) e os núcleos corados com DAPI (azul). As imagens foram obtidas no aumento de 20X em *high content imaging* (Operetta®). Barra de escala = 2 mm.

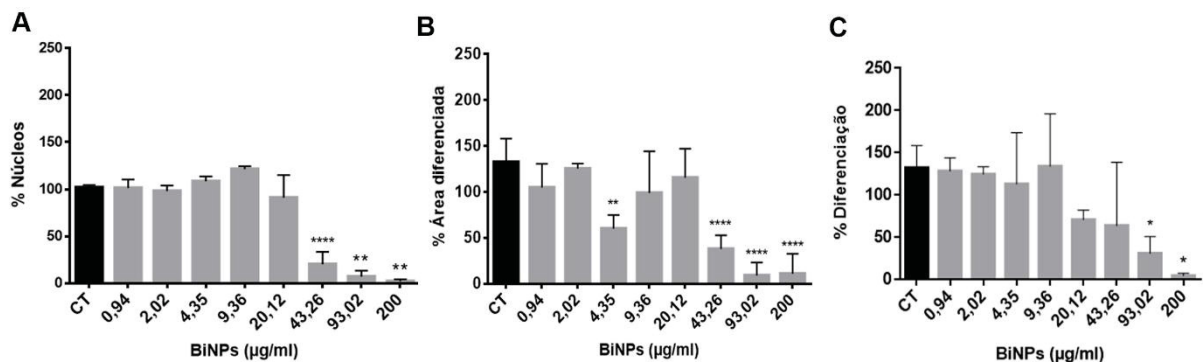


Figura 33: Análise quantitativa do potencial de diferenciação osteogênica de ADSCs após tratamento repetido com BiNPs. A eficiência de diferenciação foi avaliada no vigésimo primeiro dia de diferenciação, após exposição repetida à BiNPs na faixa de concentração de 0,94 - 200 $\mu\text{g/ml}$. A análise quantitativa realizada em sistema *high content imaging* (Operetta®) foi expressa em número de núcleos (A), área de diferenciação (μm^2) marcada com Osteolmage (B) e percentual de diferenciação ($\mu\text{m}^2/\text{número de núcleos}$) (C). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão e foram analisados em relação ao controle (CT) ($n = 4$). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett. Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao controle (CT): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$.

5 DISCUSSÃO

O crescimento exponencial na aplicação de NPs para o desenvolvimento de produtos destinados ao uso humano tem levantado discussões acerca dos potenciais efeitos adversos à saúde e ao meio ambiente associados com a exposição a esses NMs (ARMSTEAD; LI, 2016). No entanto, a avaliação toxicológica de NPs permanece um desafio, uma vez que o comportamento desses NMs é fortemente influenciado por suas propriedades físico-químicas (FADEEL et al., 2018), que podem variar de acordo com a composição, tamanho, morfologia e funcionalização de cada NP (KHAN; SAEED; KHAN, 2019). Por essa razão, os dados disponíveis na literatura sobre a segurança de NPs e seus efeitos à saúde humana são conflitantes, inclusive para NPs derivadas do mesmo material (AZHDARZADEH et al., 2015). Enquanto a comunidade científica vem empregando esforços contínuos em prol do estabelecimento de uma normativa mundial para avaliação de risco de NMs (OECD WPMN, 2006; REACH Annex, 2007), é essencial que cada NP seja submetida à uma avaliação toxicológica cuidadosamente planejada antes de sua disponibilização comercial (AZHDARZADEH et al., 2015).

Nesse contexto, a investigação dos efeitos de BiNPs em sistemas biológicos torna-se extremamente necessária, visto que as principais aplicações visadas para as BiNPs são voltadas à área biomédica (GOMEZ; HALLOT; PORT, 2018). Embora o bismuto em sua forma bruta tenha sido largamente empregado como matéria-prima para a formulação de produtos farmacêuticos ao longo das últimas décadas, o interesse pelo bismuto em nanoescala ainda é recente (SHAHBAZI et al., 2020), o que torna a literatura acerca da toxicidade de BiNPs escassa, especialmente em células humanas (ABUDAYYAK et al., 2017). Dessa forma, neste trabalho buscou-se avaliar os potenciais efeitos citotóxicos de BiNPs utilizando ADSCs como modelo *in vitro*.

Sabendo que as propriedades físico-químicas das NPs são determinantes para sua interação com sistemas biológicos (SUKHANOVA et al., 2018), a primeira etapa da avaliação nanotoxicológica consistiu na caracterização físico-química de BiNPs produzidas por LASiS. A presença do elemento bismuto na solução de BiNPs foi confirmada pela técnica de espectroscopia UV/VIS, a qual mede a intensidade da luz refletida da amostra de interesse e a compara com a intensidade de luz refletida do material de referência (MOURDIKOUUDIS; PALLARES; THANH, 2018). Os dados provenientes da caracterização por UV/VIS demonstraram que as BiNPs possuem

pico plasmônico em torno de 260 nm, o que corrobora o espectro de absorção na faixa de 250 – 260 nm previamente identificado para BiNPs de síntese física, confirmando o caráter metálico das BiNPs. (BEZERRA et al., 2017).

A dispersão de tamanho das BiNPs foi inicialmente determinada pela técnica de DLS, que detecta o tamanho hidrodinâmico de NPs a partir da medida de flutuações na intensidade de luz refletida resultante do movimento Browniano das partículas em solução (KIM et al., 2019). Assim como grande parte das técnicas disponíveis para caracterização de NPs, o DLS apresenta limitações metodológicas que devem ser consideradas. Em amostras contendo NPs de tamanho heterogêneo, como é o caso das BiNPs, partículas de tamanho elevado tendem a refletir a luz em intensidade maior do que partículas pequenas, o que acaba por mascarar a presença de NPs de tamanho reduzido na solução (MOURDIKOU DIS; PALLARES; THANH, 2018). Tal fenômeno pôde ser evidenciado para as BiNPs, onde a distribuição de tamanho adquirida por DLS não detectou a presença de partículas pequenas que haviam sido quantificadas por MET, demonstrando a baixa sensibilidade do DLS para NPs de tamanho heterogêneo.

A MET é uma técnica direta de quantificação que se baseia na medida individual do tamanho de cada NP para determinar a distribuição de tamanho em uma solução com base no número total de partículas analisadas. Além disso, a MET fornece evidências diretas sobre a morfologia de NPs, o que não é possível de se obter através de metodologias indiretas de mensuração do tamanho de NPs, como o DLS (CAPUTO et al., 2019). Embora para as BiNPs tenha havido divergência entre os dados da MET e do DLS, ambas as técnicas apresentam alta concordância quando empregadas para análise da distribuição de tamanho de NPs homogêneas (TEULON et al., 2019). Dessa forma, a metodologia ideal para determinação do tamanho de NPs deve ser selecionada de acordo a natureza da NPs à ser investigada, levando em consideração as vantagens e desvantagens de cada abordagem disponível (CAPUTO et al., 2019). Nesse sentido, pode-se considerar que a MET forneceu resultados mais precisos em relação a ampla distribuição de tamanho das BiNPs do que o DLS.

Outro ponto importante é a determinação da carga superficial das NPs, a qual está diretamente relacionada com a estabilidade da solução e é comumente mensurada através do potencial zeta. No geral, NPs com potencial zeta mais positivo ou negativo que ± 30 mV indicam que a solução possui boa estabilidade devido à intensa repulsão eletrostática entre as partículas (JOSEPH; SINGHVI, 2019). Por

outro lado, soluções com potencial zeta fora desse intervalo podem exibir instabilidade física, pois as forças de repulsão entre as partículas não são fortes o suficiente para evitar a agregação e a floculação das NPs presentes na solução (KUMAR; DIXIT, 2017). Conforme os dados de potencial zeta apresentados, os lotes de BiNPs demonstraram potencial instabilidade, apesar de não terem sido observadas aglomerações de BiNPs na caracterização morfológica por MET. Como aponta Mahbubul (2019), a estabilidade de soluções de NPs tende a decair ao longo do tempo, reduzindo assim o potencial zeta da solução. Considerando o grande intervalo de tempo entre a síntese das BiNPs e a análise do potencial zeta, é possível que os baixos valores observados sejam resultado do processo de degradação das amostras, não refletindo assim a estabilidade de BiNPs recém-sintetizadas. Essa possibilidade é corroborada por dados prévios de nosso grupo, onde o potencial zeta de BiNPs recém-sintetizadas foi calculado em +39,1 mV (REUS et al., 2018). A fim de esclarecer essa questão, experimentos adicionais de avaliação periódica do potencial zeta de BiNPs serão necessários para confirmar esta hipótese e estabelecer o período máximo de uso de BiNPs após a síntese. Apesar disso, em função da concordância dos demais parâmetros físico-químicos avaliados, os lotes de BiNPs sintetizados de maneira independente foram considerados equivalentes em termos de características físico-químicas, garantindo assim a reprodutibilidade dos ensaios biológicos.

Uma vez concluída a etapa de caracterização físico-química, buscou-se determinar os efeitos de BiNPs sobre a viabilidade celular de ADSCs. Embora a literatura sobre a toxicidade de BiNPs ainda seja escassa, já existem relatos acerca do comprometimento da viabilidade celular após exposição ao bismuto em nanoescala. Estudos anteriores evidenciaram a diminuição da viabilidade celular relativa de células RAW 264.7 e BALB/c 3T3 tratadas com concentrações superiores a 20 µg/ml de BiNPs produzidas por LASiS (LUZ et al., 2020; REUS et al., 2018). Similarmente, NPs de óxido de bismuto na faixa de concentração de 50 a 300 µg/ml promoveram redução dose-dependente na viabilidade celular de células MCF-7 após 24 horas de tratamento (AHAMED et al., 2019). Em outro trabalho, foi demonstrado que NPs de bismuto produzidas pela bactéria *Delftia* sp. provocaram a queda da viabilidade relativa das linhagens celulares MCF-7, A549 e 3T3 a partir da concentração de 5 µg/ml (SHAKIBAIE et al., 2018). De acordo com nossos resultados, as BiNPs afetaram negativamente a viabilidade celular de ADSCs somente quando empregadas em altas concentrações ($\geq 234,69$ µg/ml) e, em associação com os

valores de IC_{50} , foram consideradas de baixa citotoxicidade para este tipo celular. Interessantemente, o IC_{50} obtido para ADSCs expostas a BiNPs é de 3 a 8 vezes maior do que previamente descrito para linhagens celulares humanas tratadas com NPs de óxido de bismuto, por exemplo (ABUDAYYAK et al., 2017), sugerindo que ADSCs indiferenciadas são capazes de manter a viabilidade celular mesmo em altas concentrações de BiNPs produzidas por LASiS. De maneira semelhante, ADSCs foram previamente relatadas como mais resistentes do que outras linhagens de mamíferos quando expostas a substâncias citotóxicas em ensaios de viabilidade celular relativa (ABUD et al., 2015).

Em concentrações mais baixas, no entanto, os ensaios de viabilidade celular apontaram um possível estímulo na proliferação celular de ADSCs desencadeado pelas BiNPs. Sendo assim, foram empregadas duas metodologias distintas para determinar se as BiNPs estariam efetivamente estimulando a proliferação das ADSCs. A primeira delas baseou-se na imunomarcagem da proteína nuclear Ki-67, a qual é expressa somente durante as fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, estando inativa na fase G0 (YUAN et al., 2015). Em paralelo, a proliferação celular foi mensurada através da incorporação de EdU, que, por ser um nucleosídeo análogo da timina, é integrado as fitas de DNA sintetizadas durante a fase S do ciclo celular (BIRAM; SHULMAN, 2020). Dessa forma, o Ki-67 revela a quantidade de células que não estão em G0 no momento final do experimento, ao passo que o EdU indica a percentagem total de DNA sintetizado durante o período de exposição desejado (HASSLUND; O'KEEFE; AWAD, 2014). Como evidenciado por ambos os ensaios, concentrações não citotóxicas de BiNPs exerceram efeito estimulatório na proliferação celular de ADSCs.

A proliferação celular é um dos mecanismos celulares básicos de células-tronco mais suscetíveis a modulação por NMs (DAYEM; LEE; CHO, 2018). Corroborando os resultados observados para as BiNPs, Kim e colaboradores (2015) demonstraram que *scaffolds* para regeneração óssea e cartilaginosa contendo NPs de sílica com tamanho entre 50 e 120 nm promoveram a proliferação celular de ADSCs através da ativação da via de sinalização ERK1/2. Da mesma forma, a proliferação de células-tronco do ligamento periodontal humano foi efetivamente estimulada por NPs de ouro de 60 nm, abrindo espaço para aplicação destas NPs na odontologia (LI et al., 2016). É importante ressaltar que esses estudos, bem como grande parte da literatura, exploraram o potencial proliferativo de NPs como ferramentas terapêuticas voltadas para medicina regenerativa (revisado por DAYEM; LEE; CHO, 2018). No entanto, a

homeostase tecidual é normalmente mantida através do balanço entre a proliferação de CTMs, que mantém um número mínimo de células residentes no tecido, e a diferenciação, que renova tipos celulares específicos e repara células danificadas (revisado por GURUSAMY et al., 2018). Para garantir a substituição eficiente de células danificadas, ao mesmo tempo que limita o potencial de formação tumoral, a taxa de proliferação das células-tronco progenitoras deve ser correspondente às demandas do tecido no momento (BITEAU; HOCHMUTH; JASPER, 2011). Assim, as implicações do efeito proliferativo de BiNPs em ADSCs requerem uma avaliação mais aprofundada acerca dos mecanismos de ação promotores da proliferação.

A atividade mitocondrial foi outra função celular de ADSCs afetada por BiNPs. Como organelas altamente dinâmicas, as mitocôndrias regulam não somente o metabolismo celular através da síntese de ATP mas fornecem também suporte para outros fenômenos celulares, tais como a proliferação e a diferenciação celular (GUO et al., 2018; SEO; YOON; DO, 2018). O primeiro indício de que as BiNPs estariam causando alterações no metabolismo mitocondrial de ADSCs foi observado no ensaio do MTT, o qual detectou um aumento expressivo na formação de cristais de formazan. Sendo o ensaio do MTT baseado na capacidade de mitocôndrias de células viáveis em converterem o sal MTT em formazan (VINKEN; BLAAUBOER, 2017b), estudos prévios associaram a elevação na conversão de formazan com aumento da massa e/ou indução de hiperatividade das mitocôndrias (RAI et al., 2018). De acordo com os resultados dos ensaios de toxicidade mitocondrial, as BiNPs não promoveram aumento na massa mitocondrial, mas induziram hiperatividade mitocondrial, o que foi evidenciado pelo aumento significativo no potencial de membrana mitocondrial de ADSCs.

O potencial de membrana mitocondrial gerado pelas bombas de prótons é essencial para o processo de armazenamento de energia durante a fosforilação oxidativa. Em conjunto com o gradiente de prótons, o potencial de membrana mitocondrial compõe o potencial transmembrana, o qual é posteriormente aproveitado para produção de ATP (MARCHI et al., 2012; ZOROVA et al., 2018a). Sabe-se que o potencial de membrana mitocondrial está diretamente correlacionado com a formação de EROs, uma vez que estas espécies reativas são formadas como subprodutos do metabolismo celular normal da cadeia transportadora de elétrons (DAN DUNN et al., 2015). Em condições celulares adversas, no entanto, as células podem promover a geração excessiva de EROs e, conseqüentemente, aumento nos níveis de estresse

celular (KIM; RYU, 2013). Alguns estudos apontam que a formação excessiva de EROs é acompanhada por um aumento significativo no potencial de membrana mitocondrial e vice-versa (PYATRIKAS et al., 2015; ZOROVA et al., 2018b). Embora a formação de EROs não tenha sido investigada neste trabalho, estudos prévios correlacionaram diferentes tipos de NPs com a geração de EROs (revisado por YU et al., 2020), inclusive NPs de óxido de bismuto (AHAMED et al., 2019). É possível, portanto, que o elevado potencial de membrana mitocondrial registrado para as ADSCs seja resultado da produção excessiva de EROs mediada pelo tratamento com BiNPs, o que poderia teoricamente resultar em morte celular programada ou altos níveis de estresse oxidativo (ZOROVA et al., 2018a).

A interferência de concentrações não citotóxicas de BiNPs com a proliferação celular e a atividade mitocondrial de ADSCs não foi acompanhada por alterações morfológicas estruturais. Sob tratamento citotóxico (302,24 µg/ml), entretanto, as ADSCs apresentaram alta desorganização estrutural e indícios de danos celulares, como a presença de estruturas de membrana dupla no citoplasma. Essas estruturas são marcantes durante o processo de autofagia, no qual estruturas celulares danificadas são degradadas em vesículas de membrana dupla no ambiente intracelular (CHIARELLI; ROCCHERI, 2012). O desbalanço nesse processo pode provocar diferentes danos celulares, como disfunção mitocondrial, comprometimento do retículo endoplasmático e morte celular programada (FENG et al., 2020). Uma vez que as vias autofágicas não foram investigadas neste trabalho, não é possível afirmar que este processo é estimulado somente a partir da observação de figuras de mielina. Apesar disso, sabe-se que a autofagia é um dos mecanismos celulares de toxicidade estimulados por NPs de óxido de bismuto (LIU et al., 2017) e outros tipos de NPs em células humanas (FENG et al., 2020; GUO et al., 2020), podendo, portanto, ser um dos mecanismos de citotoxicidade de BiNPs de síntese física.

Interessantemente, ao analisarmos as imagens adquiridas por MET, não foi possível observar a presença de BiNPs no ambiente intracelular de ADSCs em nenhum dos tratamentos, indicando que estas NPs não necessitam de internalização para modularem mecanismos celulares essenciais. Para NPs metálicas, como é o caso das BiNPs, a toxicidade celular está diretamente relacionada com a liberação de íons de metal contidos no núcleo da NP para o meio de cultura (SOENEN et al., 2015; SUKHANOVA et al., 2018). Liu e colaboradores (2017), por exemplo, atribuíram parte dos efeitos citotóxicos de promoção de autofagia em células HEK293, à liberação de

íons de bismuto no cultivo. Com isso, pode-se sugerir que os efeitos celulares adversos provocados por BiNPs em ADSCs estejam parcialmente associados com a presença de íons de bismuto livres em solução, os quais não são capturados por MET. Alternativamente, a mensuração de íons metálicos em amostras biológicas pode ser realizada através de espectroscopia de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) (WILSCHEFSKI; BAXTER, 2019), sendo esta uma alternativa interessante para ensaios adicionais de quantificação de íons bismuto em ADSCs.

Uma das grandes vantagens do emprego de CTMs como modelos *in vitro* para ensaios de toxicidade é a possibilidade de avaliação de efeitos citotóxicos sobre o processo de diferenciação celular, que é uma função celular específica de CTMs (KIM; CHE; YUN, 2019; LIU; YIN; FAIOLA, 2017; PITTENGER et al., 2019). Como as NPs atuam sobre diferentes tipos celulares de acordo com seu mecanismo de ação, os ensaios de toxicidade baseados em funções celulares específicas podem revelar efeitos citotóxicos desencadeados por NPs que não seriam identificados em ensaios generalistas de citotoxicidade, como os de viabilidade celular, por exemplo (XU et al., 2017). Esse fenômeno foi observado em nosso trabalho, onde concentrações não citotóxicas de BiNPs nos ensaios de viabilidade celular relativa promoveram inibição significativa da diferenciação adipogênica de ADSCs. Como discutido anteriormente, a adipogênese é um processo celular altamente regulado governado por células-tronco através do qual pré-adipócitos dão origem aos adipócitos maduros que irão compor o tecido adiposo e este, por sua vez, tem papel crucial na manutenção da homeostase corporal, sendo fonte básica de ácidos graxos para geração de calor e energia (AHMAD et al., 2020; DAYEM et al., 2016).

A adipogênese é regulada por inúmeros fatores de transcrição que atuam na iniciação e promoção da diferenciação, incluindo o PPAR γ e o C/EBP α , que são comumente descritos como os principais reguladores positivos da via adipogênica (KHALILPOURFARSHBAFI et al., 2019). Após a indução da adipogênese, a elevação dos níveis de AMP cíclico promove a fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB). Uma vez fosforilada, a CREB induz a expressão de C/EBP β , que faz parte da família de proteínas de ligação ao CCAAT (C/EBPs). Com isso, a ligação do C/EBP β a elementos reguladores promove a ativação da transcrição de PPAR γ e C/EBP α . Uma vez expresso, o C/EBP α mantém a expressão contínua tanto de si mesmo quanto do PPAR γ através da ligação ao seu respectivo elemento regulador da família C/EBP (CHEN et al., 2016; ROSEN; MACDOUGALD,

2006). Dessa forma, PPAR γ e C/EBP α se autorregulam em um sistema de *feedback* positivo, ao mesmo tempo que controlam a expressão de marcadores tardios da via adipogênica, como o FABP4 (TONTONNOZ; SPIEGELMAN, 2008). Ao contrário da regulação negativa do C/EBP β nos estágios tardios da adipogênese, o PPAR γ e o C/EBP α mantêm altos níveis de expressão durante toda a diferenciação e continuam a ser expressos em adipócitos maduros (CHEN et al., 2016). Por essa razão, grande parte dos compostos que modulam a diferenciação adipogênica apresentam efeito direto sobre a expressão de PPAR γ e C/EBP α (KIM et al., 2018), inclusive NPs (YUAN et al., 2019).

Em concordância com os resultados obtidos para BiNPs, Yang e colaboradores (2017) verificaram que NPs de sílica inibiram a diferenciação adipogênica de CTMs ao regularem negativamente a expressão de PPAR γ , C/EBP α e FABP4 após 14 dias de indução adipogênica. Os mesmos marcadores foram inibidos por baixas concentrações de NPs de carbonato de cálcio, resultando na redução da adipogênese de CTMs após 7 ou 14 dias de diferenciação (LI et al., 2018b). É interessante ressaltar que ambos os estudos mencionados anteriormente focaram na atividade inibitória de NPs sobre a diferenciação adipogênica para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da obesidade (YANG et al., 2017, LI et al., 2018b). Assim, a ação inibitória de BiNPs na adipogênese poderia dar origem a uma potencial área de aplicação destas NPs no desenvolvimento de drogas antiobesidade (SIBUYI et al., 2019; TSOU et al., 2019).

Idealmente, os ensaios de toxicidade *in vitro* devem mimetizar um cenário real de exposição para garantir a acurácia na correlação com os efeitos em sistemas *in vivo* (VINKEN; BLAAUBOER, 2017a). Com o crescente avanço no emprego de NPs em diferentes áreas, os organismos vivos encontram-se continuamente expostos a esses NMs em sua rotina diária, especialmente no caso de NPs empregadas na indústria biomédica e farmacêutica (DE MATTEIS, 2017). Comparando os protocolos de exposição única e exposição repetida à BiNPs durante a adipogênese, observou-se que o tratamento repetido provocou uma redução ligeiramente mais acentuada nos níveis de expressão dos marcadores PPAR γ , C/EBP α e FABP4 do que a exposição única. Apesar disso, a inibição da adipogênese observada para o tratamento único, sugere que a presença de BiNPs durante os 3 primeiros dias da diferenciação, período mínimo necessário para desencadear a cascata regulatória da adipogênese e a regulação positiva de PPAR γ e C/EBP α (MARCON et al., 2017; SPANGENBERG et

al., 2013), é suficiente para interferir com a via adipogênica. Conforme revisado por Shahbazi e colaboradores (2020), as BiNPs são investigadas principalmente quanto a sua potencial aplicação na área biomédica, podendo atuar no diagnóstico por imagem e no tratamento de infecções bacterianas. Dessa forma, é imprescindível que seus efeitos adversos sejam cuidadosamente avaliados também em mecanismos celulares que não são o alvo específico de sua aplicação de forma a garantir o emprego seguro e eficaz destas NPs em produtos voltados ao uso humano (FRIEDMAN; CLAYPOOL; LIU, 2013; RUDMANN, 2013).

Em teoria, existe uma correlação inversa entre a adipogênese e a osteogênese de CTMs, na qual a promoção da diferenciação osteogênica ocorre às custas da inibição da diferenciação adipogênica e vice-versa (CHEN et al., 2016; JAMES, 2013). O balanço entre os dois tipos de diferenciação é regulado por diversas vias de sinalização que se cruzam e convergem na regulação de dois fatores de transcrição principais: o PPAR γ e o RUNX2, que atua na osteogênese. Normalmente, o aumento da expressão de um fator de transcrição está associado à regulação negativa do outro (STECHSCHULTE; LECKA-CZERNIK, 2017). Esse fenômeno já foi descrito para NPs de prata, as quais promoveram a diferenciação adipogênica de CTMs ao passo que inibiram a diferenciação osteogênica até o 7º dia após a indução (HE et al., 2016). Entretanto, essa relação não pôde ser estabelecida para BiNPs em ADSCs no presente estudo, uma vez que a diferenciação osteogênica se mostrou inconclusiva.

A eficiência de diferenciação osteogênica após tratamento com BiNPs foi quantificada de acordo com os parâmetros de área e percentual de diferenciação celular, os quais são parâmetros já validados pelo nosso grupo para quantificação da diferenciação adipogênica de ADSCs (ABUD et al., 2019). Em estágios avançados da osteogênese, a matriz mineralizada tende a se agregar para dar origem ao osso, tornando a área de diferenciação menor, embora a eficiência de diferenciação seja mantida (BLAIR et al., 2017), não refletindo assim a condição fisiológica das células. Dessa forma, são necessárias análises complementares para selecionar o parâmetro adequado para quantificação da diferenciação osteogênica de acordo com a deposição de matriz mineralizada, sendo que ensaios de RT-qPCR para determinação da expressão de fatores de transcrição-chaves na via osteogênica, como o RUNX2 e o Osteorix, poderiam fornecer dados à nível molecular sobre a atuação das BiNPs sobre a diferenciação osteogênica (CHEN et al., 2016; ROBERT et al., 2020).

De forma geral, embora os ensaios de diferenciação osteogênica não tenham sido conclusivos, a diferenciação adipogênica se mostrou um modelo mais sensível para avaliação da toxicidade de BiNPs do que ensaios de citotoxicidade tradicionais. Similarmente ao que foi observado para as BiNPs, Xu e colaboradores (2017) demonstraram que concentrações de NPs de dióxido de titânio consideradas não citotóxicas em ensaios de viabilidade celular, proliferação celular e geração de EROs reduziram a capacidade de ADSCs em curar lesões cutâneas, que é uma das funções específicas de CTMs, e inibiram a diferenciação adipogênica (XU et al., 2017). O mesmo efeito foi observado para CTMs tratadas com baixas concentrações de triclosan, sendo a diferenciação adipogênica afetada em detrimento da viabilidade celular (GUO et al., 2012). Embora a diferenciação adipogênica tenha detectado danos celulares precoces provocados por BiNPs, os ensaios de citotoxicidade generalistas são igualmente importantes, visto que a avaliação nanotoxicológica deve ser baseada em múltiplos parâmetros celulares para fornecer uma visão abrangente da atividade biológica de NPs (FARCAL et al., 2015).

Assim, os resultados demonstraram que BiNPs de síntese física produzidas por LASiS interferem com a capacidade de autorrenovação e diferenciação celular de ADSCs. Em concentrações usuais e não citotóxicas nos ensaios de viabilidade celular relativa, as BiNPs promoveram a inibição do potencial de diferenciação adipogênica, além de afetarem mecanismos celulares básicos, tais como a proliferação celular e a atividade mitocondrial de ADSCs. Esses dados reforçaram a importância de uma avaliação nanotoxicológica completa analisando-se múltiplos parâmetros celulares para NPs com possíveis aplicações biomédicas, como é o caso das BiNPs, antes de sua comercialização (MUSAZZI et al., 2017). Ademais, nossos resultados abrem espaço para ampliação da utilização de ADSCs e CTMs de outras fontes como modelos *in vitro* alternativos para ensaios de toxicidade, possibilitando uma melhor compreensão dos mecanismos de toxicidade de NPs em células humanas (KIM; CHE; YUN, 2019).

6 CONCLUSÃO

Lotes independentes de BiNPs produzidos por LASiS apresentaram característica físico-químicas equivalentes, demonstrando morfologia esférica e ampla distribuição de tamanho. As BiNPs apresentaram possível instabilidade, o que pode estar associado com o amplo intervalo de tempo entre a síntese e a mensuração do potencial zeta.

A viabilidade celular de ADSCs foi prejudicada somente em altas concentrações de BiNPs. Os ensaios do VN, MTT e DAPI evidenciaram perfil citotóxico semelhante para BiNPs, não havendo diferença significativa entre os valores de IC_{50} para cada método.

As BiNPs estimularam hiperatividade mitocondrial em ADSCs em baixas concentrações.

A proliferação celular de ADSCs foi estimulada em baixas concentrações de BiNPs.

Sob tratamento citotóxico, as células exibiram indícios de estresse celular. Entretanto, não foram detectadas BiNPs no ambiente intracelular, sugerindo que o efeito citotóxico observado não advém da internalização das partículas.

A diferenciação adipogênica foi afetada negativamente por BiNPs, sendo o protocolo de exposição contínua ligeiramente mais citotóxico. A redução na adipogênese também foi observada na exposição única, indicando que a presença de BiNPs durante os três primeiros dias após indução da diferenciação é suficiente para comprometer a adipogênese.

7 PERSPECTIVAS

- Verificar a janela de tempo adequada para determinação da estabilidade de BiNPs através do potencial zeta;
- Investigar a formação de EROs com o propósito de aprofundar as análises acerca dos mecanismos de toxicidade mitocondrial;
- Investigar os possíveis mecanismos de proliferação celular afetados por BiNPs de forma a confirmar se este efeito é exclusivo de CTMs;
- Quantificar a presença de BiNPs intracelulares através de análises físico-químicas de ICP-OS;
- Determinar as vias de sinalização da adipogênese que são inibidas pelas BiNPs;
- Estabelecer novas estratégias de análise para quantificação dos efeitos de BiNPs na diferenciação osteogênica de ADSCs.

8 REFERÊNCIAS

ABDELKHALIQ, Ashraf; VAN DER ZANDE, Meike; PUNT, Ans; HELSDINGEN, Richard; BOEREN, Sjef; VERVOORT, Jacques J. M.; RIETJENS, Ivonne M. C. M.; BOUWMEESTER, Hans. Impact of nanoparticle surface functionalization on the protein corona and cellular adhesion, uptake and transport. **Journal of Nanobiotechnology**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1–13, 2018. DOI: 10.1186/s12951-018-0394-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0394-6>.

ABUD, Ana Paula Ressett; KULIGOVSKI, Crisciele; CORRÊA, Natássia Caroline Resende; DE MORAES, Elizabeth Cunha Penna; CARUSO, Rodrigo Rêgo Barros; SCHUCK, Desirée Cigaran; BROHEM, Carla Abdo; DALLAGIOVANNA, Bruno; DE AGUIAR, Alessandra Melo. The inhibition of adipogenesis via an in vitro assay can reduce animal use by more precisely estimating the starting dose for the acute toxic class method. **Toxicology Letters**, [S. l.], v. 311, n. March, p. 80–90, 2019. DOI: 10.1016/j.toxlet.2019.04.009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.04.009>.

ABUD, Ana Paula Ressetti; ZYCH, Jaiesa; REUS, Thamile Luciane; KULIGOVSKI, Crisciele; DE MORAES, Elizabeth; DALLAGIOVANNA, Bruno; DE AGUIAR, Alessandra Melo. The use of human adipose-derived stem cells based cytotoxicity assay for acute toxicity test. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 73, n. 3, p. 992–998, 2015. DOI: 10.1016/j.yrtph.2015.09.015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.015>.

ABUDAYYAK, Mahmoud; ÖZTAŞ, Ezgi; ARICI, Merve; ÖZHAN, Gül. Investigation of the toxicity of bismuth oxide nanoparticles in various cell lines. **Chemosphere**, [S. l.], v. 169, p. 117–123, 2017. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.018.

AHAMED, Maqsood; AKHTAR, Mohd Javed; KHAN, M. A. Majee.; ALROKAYAN, Salman A.; ALHADLAQ, Hisham A. Oxidative stress mediated cytotoxicity and apoptosis response of bismuth oxide (Bi₂O₃) nanoparticles in human breast cancer (MCF-7) cells. **Chemosphere**, [S. l.], v. 216, p. 823–831, 2019. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.10.214. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.214>.

AHMAD, Bilal; SERPELL, Christopher J.; FONG, Isabel Lim; WONG, Eng Hwa. Molecular Mechanisms of Adipogenesis: The Anti-adipogenic Role of AMP-Activated Protein Kinase. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [S. l.], v. 7, n. May, p. 1–22, 2020. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00076.

AKÇAN, Ramazan; AYDOGAN, Halit Canberk; YILDIRIM, Mahmut Şerif; TAŞTEKİN, Burak; SAĞLAM, Necdet. Nanotoxicity: A challenge for future medicine. **Turkish Journal of Medical Sciences**, [S. l.], v. 50, n. 4, p. 1180–1196, 2020. DOI: 10.3906/sag-1912-209.

ALIMARDANI, Vahid; ABOLMAALI, Samira Sadat; TAMADDON, Ali Mohammad. Recent Advances on Nanotechnology-Based Strategies for Prevention, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Infections. **Journal of Nanomaterials**, [S. l.], v. 2021,

p. 1–20, 2021. DOI: 10.1155/2021/9495126.

ANDRZEJEWSKA, Anna; LUKOMSKA, Barbara; JANOWSKI, Mirosław. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. **Stem Cells**, [S. l.], v. 37, n. 7, p. 855–864, 2019. DOI: 10.1002/stem.3016.

ARMSTEAD, Andrea L.; LI, Bingyun. Nanotoxicity: Emerging concerns regarding nanomaterial safety and occupational hard metal (WC-Co) nanoparticle exposure. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v. 11, p. 6421–6433, 2016. DOI: 10.2147/IJN.S121238.

ATTARILAR, Shokouh; YANG, Jinfan; EBRAHIMI, Mahmoud; WANG, Qingge; LIU, Jia; TANG, Yujin; YANG, Junlin. The Toxicity Phenomenon and the Related Occurrence in Metal and Metal Oxide Nanoparticles: A Brief Review From the Biomedical Perspective. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 8, n. July, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00822.

AZHDARZADEH, Morteza et al. Nanotoxicology: Advances and pitfalls in research methodology. **Nanomedicine**, [S. l.], v. 10, n. 18, p. 2931–2952, 2015. DOI: 10.2217/nnm.15.130.

BACAKOVA, Lucie et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 1111–1126, 2018. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.03.011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.011>.

BADIREDDY, Appala Raju; HERNANDEZ-DELGADILLO, Rene; SÁNCHEZ-NÁJERA, Rosa Isela; CHELLAM, Shankaraman; CABRAL-ROMERO, Claudio. Synthesis and characterization of lipophilic bismuth dimercaptopropanol nanoparticles and their effects on oral microorganisms growth and biofilm formation. **Journal of Nanoparticle Research**, [S. l.], v. 16, n. 6, 2014. DOI: 10.1007/s11051-014-2456-5.

BADRIGILAN, Samireh; HEYDARPANAHI, Fatemeh; CHOUPANI, Jalal; JAYMAND, Mehdi; SAMADIAN, Hadi; HOSEINI-GHAHFAROKHI, Mojtaba; WEBSTER, Thomas J.; TAYEBI, Lobat. A review on the biodistribution, pharmacokinetics and toxicity of bismuth-based nanomaterials. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v. 15, p. 7079–7096, 2020. DOI: 10.2147/IJN.S250001.

BAIG, Nadeem; KAMMAKAKAM, Irshad; FALATH, Wail; KAMMAKAKAM, Irshad. Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. **Materials Advances**, [S. l.], v. 2, n. 6, p. 1821–1871, 2021. DOI: 10.1039/d0ma00807a.

BAJEK, Anna; GURTOWSKA, Natalia; OLKOWSKA, Joanna; KAZMIERSKI, Lukasz; MAJ, Malgorzata; DREWA, Tomasz. Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, [S. l.], v. 64, n. 6, p. 443–454, 2016. DOI: 10.1007/s00005-016-0394-x.

BAYDA, Samer; ADEEL, Muhammad; TUCCINARDI, Tiziano; CORDANI, Marco;

RIZZOLIO, Flavio. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 1–15, 2020. DOI: 10.3390/molecules25010112.

BEZERRA, A. G.; CAVASSIN, P.; MACHADO, T. N.; WOISKI, T. D.; CAETANO, R.; SCHREINER, W. H. Surface-enhanced Raman scattering using bismuth nanoparticles: a study with amino acids. **Journal of Nanoparticle Research**, [S. l.], v. 19, n. 11, 2017. DOI: 10.1007/s11051-017-4057-6.

BHUSHAN, Bharat; WINKELMANN, Kurt. **Global Perspectives of Nanoscience and Engineering Education**. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1007/978-3-319-31833-2. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-31833-2>.

BIRAM, Adi; SHULMAN, Ziv. Evaluation of B Cell Proliferation in vivo by EdU Incorporation Assay. **Bio-Protocol**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 1–7, 2020. DOI: 10.21769/bioprotoc.3602.

BITEAU, Benoit; HOCHMUTH, Christine E.; JASPER, Heinrich. Maintaining tissue homeostasis: Dynamic control of somatic stem cell activity. **Cell Stem Cell**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 402–411, 2011. DOI: 10.1016/j.stem.2011.10.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2011.10.004>.

BLAIR, Harry C. et al. Osteoblast differentiation and bone matrix formation in vivo and in vitro. **Tissue Engineering - Part B: Reviews**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 268–280, 2017. DOI: 10.1089/ten.teb.2016.0454.

BORBINHA, Cláudia; SERRAZINA, Filipa; SALAVISA, Manuel; VIANA-BAPTISTA, Miguel. Bismuth encephalopathy- a rare complication of long-standing use of bismuth subsalicylate. **BMC Neurology**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 1–5, 2019. DOI: 10.1186/s12883-019-1437-9.

BROWN, Anna L.; GOFORTH, Andrea M. PH-dependent synthesis and stability of aqueous, elemental bismuth glyconanoparticle colloids: Potentially biocompatible X-ray contrast agents. **Chemistry of Materials**, [S. l.], v. 24, n. 9, p. 1599–1605, 2012. DOI: 10.1021/cm300083j.

BUCKMAN, Jennifer F.; HERNÁNDEZ, Hélène; KRESS, Geraldine J.; VOTYAKOVA, Tatyana V.; PAL, Sumon; REYNOLDS, Ian J. MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: Influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. **Journal of Neuroscience Methods**, [S. l.], v. 104, n. 2, p. 165–176, 2001. DOI: 10.1016/S0165-0270(00)00340-X.

CAPLAN, Arnold I. Mesenchymal stem cells: Time to change the name! **Stem Cells Translational Medicine**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. 1445–1451, 2017. DOI: 10.1002/sctm.17-0051.

CAPUTO, F.; CLOGSTON, J.; CALZOLAI, L.; RÖSSLEIN, M.; PRINA-MELLO, A. Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v.

299, n. December 2018, p. 31–43, 2019. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.02.030.

CHEN, Q. et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: Adipocytes or osteoblasts? **Cell Death and Differentiation**, [S. l.], v. 23, n. 7, p. 1128–1139, 2016. DOI: 10.1038/cdd.2015.168.

CHIARELLI, Roberto; ROCCHERI, Maria Carmela. Heavy Metals and Metalloids as Autophagy Inducing Agents: Focus on Cadmium and Arsenic. **Cells**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 597–616, 2012. DOI: 10.3390/cells1030597.

CHOE, Sung Sik; HUH, Jin Young; HWANG, In Jae; KIM, Jong In; KIM, Jae Bum. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. **Frontiers in Endocrinology**, [S. l.], v. 7, n. APR, p. 1–16, 2016. DOI: 10.3389/fendo.2016.00030.

CHOI, Seon Young; SONG, Min Seok; RYU, Pan Dong; LAM, Anh Thu Ngoc; JOO, Sang Woo; LEE, So Yeong. Gold nanoparticles promote osteogenic differentiation in human adipose-derived mesenchymal stem cells through the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v. 10, p. 4383–4392, 2015. DOI: 10.2147/IJN.S78775.

CONTADO, Catia. Nanomaterials in consumer products: A challenging analytical problem. **Frontiers in Chemistry**, [S. l.], v. 3, n. AUG, p. 1–20, 2015. DOI: 10.3389/fchem.2015.00048.

DAN DUNN, Joe; ALVAREZ, Luis A. J.; ZHANG, Xuezhong; SOLDATI, Thierry. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. **Redox Biology**, [S. l.], v. 6, p. 472–485, 2015. DOI: 10.1016/j.redox.2015.09.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.09.005>.

DAYEM, Ahmed Abdal; CHOI, Hye Yeon; YANG, Gwang-mo; KIM, Kyeongseok; SAHA, Subbroto Kumar; KIM, Jin-hoi; CHO, Ssang-goo. The potential of nanoparticles in stem cell differentiation and further therapeutic applications. [S. l.], p. 1–11, 2016. DOI: 10.1002/biot.201600453.

DAYEM, Ahmed Abdal; LEE, Soo Bin; CHO, Ssang Goo. The impact of metallic nanoparticles on stem cell proliferation and differentiation. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 8, n. 10, 2018. DOI: 10.3390/nano8100761.

DE MATTEIS, Valeria. Exposure to inorganic nanoparticles: Routes of entry, immune response, biodistribution and in vitro/In vivo toxicity evaluation. **Toxics**, [S. l.], v. 5, n. 4, 2017. DOI: 10.3390/toxics5040029.

DENG, Junjie; XU, Shandong; HU, Weike; XUN, Xiaojie; ZHENG, Liyuan; SU, Ming. Tumor targeted, stealthy and degradable bismuth nanoparticles for enhanced X-ray radiation therapy of breast cancer. **Biomaterials**, [S. l.], v. 154, p. 24–33, 2018. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.048. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.048>.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal

cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006. DOI: 10.1080/14653240600855905. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/14653240600855905>.

DONAHUE, Nathan D.; ACAR, Handan; WILHELM, Stefan. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 143, p. 68–96, 2019. DOI: 10.1016/j.addr.2019.04.008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.04.008>.

EALIAS, Anu Mary; SARAVANAKUMAR, M. P. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, [S. l.], v. 263, n. 3, p. 0–15, 2017. DOI: 10.1088/1757-899X/263/3/032019.

ELEMIKE, Elias E.; IBE, Kenneth A.; MBONU, Justina I.; ONWUDIWE, Damian C. **Phytonanotechnology and synthesis of silver nanoparticles**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2020. DOI: 10.1016/b978-0-12-822348-2.00005-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-822348-2.00005-X>.

ESKES, Chantra; BOSTRÖM, Ann Charlotte; BOWE, Gerhard; COECKE, Sandra; HARTUNG, Thomas; HENDRIKS, Giel; PAMIES, David; PITON, Alain; ROVIDA, Costanza. Good cell culture practices & in vitro toxicology. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 45, n. April, p. 272–277, 2017. DOI: 10.1016/j.tiv.2017.04.022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.022>.

FADEEL, Bengt et al. Advanced tools for the safety assessment of nanomaterials. **Nature Nanotechnology**, [S. l.], v. 13, n. 7, p. 537–543, 2018. DOI: 10.1038/s41565-018-0185-0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41565-018-0185-0>.

FANG, Fang; LI, Min; ZHANG, Jinfeng; LEE, Chun Sing. Different Strategies for Organic Nanoparticle Preparation in Biomedicine. **ACS Materials Letters**, [S. l.], v. 2, n. 5, p. 531–549, 2020. DOI: 10.1021/acsmaterialslett.0c00078.

FARCAL, Lucian et al. Comprehensive in vitro toxicity testing of a panel of representative oxide nanomaterials: First steps towards an intelligent testing strategy. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 1–34, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0127174.

FAVI, Pelagie Marlene; GAO, Ming; JOHANA SEPÚLVEDA ARANGO, Liuda; OSPINA, Sandra Patricia; MORALES, Mariana; PAVON, Juan Jose; WEBSTER, Thomas Jay. Shape and surface effects on the cytotoxicity of nanoparticles: Gold nanospheres versus gold nanostars. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, [S. l.], v. 103, n. 11, p. 3449–3462, 2015. DOI: 10.1002/jbm.a.35491.

FENG, Xiaoli; ZHANG, Yaqing; ZHANG, Chao; LAI, Xuan; ZHANG, Yanli; WU, Junrong; HU, Chen. Nanomaterial-mediated autophagy : coexisting hazard and health benefits in biomedicine. [S. l.], p. 1–26, 2020.

FRIEDMAN, Adam; CLAYPOOL, Sarah; LIU, Rihe. The Smart Targeting of Nanoparticles. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], v. 19, n. 35, p. 6315–6329, 2013. DOI: 10.2174/13816128113199990375.

FYTIANOS, Georgios; RAHDAR, Abbas; KYZAS, George Z. Nanomaterials in cosmetics: Recent updates. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 1–16, 2020. DOI: 10.3390/nano10050979.

GATOO, Manzoor Ahmad; NASEEM, Sufia; ARFAT, Mir Yasir; MAHMOOD DAR, Ayaz; QASIM, Khusro; ZUBAIR, Swaleha. Physicochemical properties of nanomaterials: Implication in associated toxic manifestations. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/498420.

GEHR, Peter. Interaction of nanoparticles with biological systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 172, p. 395–399, 2018. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.08.023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.023>.

GOMEZ, Catherine; HALLOT, Gauthier; PASTOR, Alexandra; LAURENT, Sophie; BRUN, Emilie; SICARD-ROSELLI, Cécile; PORT, Marc. Metallic bismuth nanoparticles: Towards a robust, productive and ultrasound assisted synthesis from batch to flow-continuous chemistry. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S. l.], v. 56, n. March, p. 167–173, 2019. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2019.04.012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.04.012>.

GOMEZ, Catherine; HALLOT, Gauthier; PORT, Marc. **Bismuth metallic nanoparticles**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2018. DOI: 10.1016/B978-0-12-813661-4.00010-9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813661-4.00010-9>.

GUO, Caixia et al. Mitochondrial dysfunction, perturbations of mitochondrial dynamics and biogenesis involved in endothelial injury induced by silica nanoparticles. **Environmental Pollution**, [S. l.], v. 236, p. 926–936, 2018. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.10.060.

GUO, Li Wu et al. Cytotoxicity and inhibitory effects of low-concentration triclosan on adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S. l.], v. 262, n. 2, p. 117–123, 2012. DOI: 10.1016/j.taap.2012.04.024. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2012.04.024>.

GUO, Lingling; HE, Nongyue; ZHAO, Yongxiang; LIU, Tonghua; DENG, Yan. Autophagy modulated by inorganic nanomaterials. **Theranostics**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 3206–3222, 2020. DOI: 10.7150/thno.40414.

GURUSAMY, Narasimman; ALSAYARI, Abdulrhman; RAJASINGH, Sheeja; RAJASINGH, Johnson. **Adult Stem Cells for Regenerative Therapy**. 1. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2018. v. 160 DOI: 10.1016/bs.pmbts.2018.07.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.07.009>.

HAKIMIAN, Fatemeh; GHOURCHIAN, Hedayatollah; HASHEMI, Azam Sadat; ARASTOO, Mohammad Reza; BEHNAM RAD, Mohammad. Ultrasensitive optical biosensor for detection of miRNA-155 using positively charged Au nanoparticles. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-20229-z. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-20229-z>.

HANNA, Hanna; MIR, Lluís M.; ANDRE, Franck M. In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. *[S. l.]*, p. 1–11, 2018.

HASSLUND, Sys; O'KEEFE, Regis J.; AWAD, Hani A. A mouse model of flexor tendon repair, chapter 6. Skeletal Development and Repair. **Methods in molecular biology**, *[S. l.]*, v. 1130, p. 233–243, 2014. DOI: 10.1007/978-1-62703-989-5. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-989-5>.

HE, Wei; ELKHOOLY, Tarek A.; LIU, Xujie; CAVALLARO, Alex; TAHERI, Shima; VASILEV, Krasimir; FENG, Qingling. Silver nanoparticle based coatings enhance adipogenesis compared to osteogenesis in human mesenchymal stem cells through oxidative stress. **Journal of Materials Chemistry B**, *[S. l.]*, v. 4, n. 8, p. 1466–1479, 2016. DOI: 10.1039/c5tb02482j. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C5TB02482J>.

HERNANDEZ-DELGADILLO, Rene; DEL ANGEL-MOSQUEDA, Casiano; SOLÍS-SOTO, Juan Manuel; MUNGUÍA-MORENO, Silvia; PINEDA-AGUILAR, Nayely; SÁNCHEZ-NÁJERA, Rosa Isela; CHELLAM, Shankararaman; CABRAL-ROMERO, Claudio. Antimicrobial and antibiofilm activities of MTA supplemented with bismuth lipophilic nanoparticles. **Dental Materials Journal**, *[S. l.]*, v. 36, n. 4, p. 503–510, 2017. DOI: 10.4012/dmj.2016-259.

HERNANDEZ-DELGADILLO, Rene; VELASCO-ARIAS, Donaji; DIAZ, David; AREVALO-NIÑO, Katiushka; GARZA-ENRIQUEZ, Marianela; DE LA GARZA-RAMOS, Myriam A.; CABRAL-ROMERO, Claudio. Zerovalent bismuth nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* growth and formation of biofilm. **International Journal of Nanomedicine**, *[S. l.]*, v. 7, p. 2109–2113, 2012. DOI: 10.2147/IJN.S29854.

HERNÁNDEZ-RIVERA, Mayra; CHO, Stephen Y.; MOGHADDAM, Sakineh E.; CHEONG, Benjamin Y.; CABREIRA-HANSEN, Maria Da Graça; WILLERSON, James T.; PERIN, Emerson C.; WILSON, Lon J. Labeling Stem Cells with a New Hybrid Bismuth/Carbon Nanotube Contrast Agent for X-Ray Imaging. **Contrast Media and Molecular Imaging**, *[S. l.]*, v. 2019, 2019. DOI: 10.1155/2019/2183051.

HOGAN, David B.; HARBIDGE, Cathy; DUNCAN, Amy. Bismuth toxicity presenting as declining mobility and falls. **Canadian Geriatrics Journal**, *[S. l.]*, v. 21, n. 4, p. 307–309, 2018. DOI: 10.5770/cgj.21.323.

HULLA, J. E.; SAHU, S. C.; HAYES, A. W. Nanotechnology: History and future. **Human and Experimental Toxicology**, *[S. l.]*, v. 34, n. 12, p. 1318–1321, 2015. DOI: 10.1177/0960327115603588.

HUSSAIN, Saber M.; WARHEIT, David B.; NG, Sheung P.; COMFORT, Kristen K.; GRABINSKI, Christin M.; BRAYDICH-STOLLE, Laura K. At the crossroads of nanotoxicology in vitro: Past achievements and current challenges. **Toxicological Sciences**, *[S. l.]*, v. 147, n. 1, p. 5–16, 2015. DOI: 10.1093/toxsci/kfv106.

IJAZ, Irfan; GILANI, Ezaz; NAZIR, Ammara; BUKHARI, Aysha. Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and

applications of nanoparticles. **Green Chemistry Letters and Reviews**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 59–81, 2020. DOI: 10.1080/17518253.2020.1802517. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17518253.2020.1802517>.

JAMES, Aaron W. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. **Scientifica**, [S. l.], v. 2013, p. 1–17, 2013. DOI: 10.1155/2013/684736.

JEEVANANDAM, Jaison; BARHOUM, Ahmed; CHAN, Yen S.; DUFRESNE, Alain; DANQUAH, Michael K. Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1050–1074, 2018. DOI: 10.3762/bjnano.9.98.

JENNINGS, Paul. “The future of in vitro toxicology”. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 29, n. 6, p. 1217–1221, 2015. DOI: 10.1016/j.tiv.2014.08.011.

JOSEPH, Emil; SINGHVI, Gautam. Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: A potential nanocarrier. **Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy**, 2019. DOI: 10.1016/B978-0-12-816505-8.00007-2. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816505-8.00007-2>.

JUNQUEIRA-KIPNIS, Ana Paula. Role of Metallic Nanoparticles in Vaccinology : Implications for Infectious Role of Metallic Nanoparticles in vaccinology : implications for infectious Disease vaccine Development. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00239.

KHALILPOURFARSHBAFI, Manizheh; GHOLAMI, Khadijeh; MURUGAN, Dharmani Devi; ABDUL SATTAR, Munavvar Zubaid; ABDULLAH, Nor Azizan. Differential effects of dietary flavonoids on adipogenesis. **European Journal of Nutrition**, [S. l.], v. 58, n. 1, p. 5–25, 2019. DOI: 10.1007/s00394-018-1663-8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-018-1663-8>.

KHAN, Ibrahim; SAEED, Khalid; KHAN, Idrees. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, [S. l.], v. 12, n. 7, p. 908–931, 2019. DOI: 10.1016/j.arabjc.2017.05.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>.

KILROY, Gail et al. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. **Journal Cellular Physiology**, [S. l.], v. 211(3), n. May, p. 736–747, 2006. DOI: 10.1002/JCP.

KIM, Ahram; NG, Wei Beng; BERNT, William; CHO, Nam Joon. Validation of Size Estimation of Nanoparticle Tracking Analysis on Polydisperse Macromolecule Assembly. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-38915-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-38915-x>.

KIM, Eun-Joon; KANG, Min-Jae; SEO, Young Bae; NAM, Soo-Wan; KIM, Gun-Do. Acer okamotoanum Nakai Leaf Extract Inhibits Adipogenesis Via Suppressing Expression of PPAR γ and C/EBP α in 3T3-L1 Cells. **J. Microbiol. Biotechnol.**, [S. l.], v. 28, n. 10, p. 1645–1653, 2018.

KIM, Ki Joo; JOE, Young Ae; KIM, Min Kyoung; LEE, Su Jin; RYU, Yeon Hee; CHO, Dong Woo; RHIE, Jong Won. Silica nanoparticles increase human adipose tissue-derived stem cell proliferation through ERK 1/2 activation. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v. 10, p. 2261–2272, 2015. DOI: 10.2147/IJN.S71925.

KIM, Soohye; RYU, Doug Young. Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. **Journal of Applied Toxicology**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 78–89, 2013. DOI: 10.1002/jat.2792.

KIM, Tae Won; CHE, Jeong Hwan; YUN, Jun Won. Use of stem cells as alternative methods to animal experimentation in predictive toxicology. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 105, n. January, p. 15–29, 2019. DOI: 10.1016/j.yrtph.2019.03.016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.03.016>.

KOCAN, Beata; MAZIARZ, Aleksandra; TABARKIEWICZ, Jacek; OCHIYA, Takahiro; BANAS-ZABCZYK, Agnieszka. Trophic Activity and Phenotype of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Background of Their Regenerative Potential. **Stem Cells International**, [S. l.], v. 2017, 2017. DOI: 10.1155/2017/1653254.

KOHL, Yvonne; GORJUP, Erwin; KATSEN-GLOBA, Alisa; BÜCHEL, Claudia; VON BRIESEN, Hagen; THIELECKE, Hagen. Effect of gold nanoparticles on adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Journal of Nanoparticle Research**, [S. l.], v. 13, n. 12, p. 6789–6803, 2011. DOI: 10.1007/s11051-011-0587-5.

KUMAR, Ajeet; DIXIT, Chandra Kumar. Methods for characterization of nanoparticles. **Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids**, [S. l.], p. 44–58, 2017. DOI: 10.1016/B978-0-08-100557-6.00003-1.

LAI, Racliffe W. S.; YEUNG, Katie W. Y.; YUNG, Mana M. N.; DJURIŠIĆ, Aleksandra B.; GIESY, John P.; LEUNG, Kenneth M. Y. Regulation of engineered nanomaterials: current challenges, insights and future directions. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 3060–3077, 2018. DOI: 10.1007/s11356-017-9489-0.

LAUSCHKE, Karin et al. A novel human pluripotent stem cell-based assay to predict developmental toxicity. **Archives of Toxicology**, [S. l.], v. 94, n. 11, p. 3831–3846, 2020. DOI: 10.1007/s00204-020-02856-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02856-6>.

LI, Chen; LI, Zhuoquan; WANG, Yan; LIU, Hongwei. Gold Nanoparticles Promote Proliferation of Human Periodontal Ligament Stem Cells and Have Limited Effects on Cells Differentiation. **Journal of Nanomaterials**, [S. l.], v. 2016, 2016. DOI: 10.1155/2016/1431836.

LI, Shishi; PAN, Huaye; TAN, Chao; SUN, Yaping; SONG, Yanrui. Mitochondrial Dysfunctions Contribute to Hypertrophic Cardiomyopathy in Patient iPSC-Derived Cardiomyocytes with MT-RNR2 Mutation. **Stem Cell Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 287–299, 2018. a. DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.11.009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.11.009>.

LI, Xiaoning; YANG, Xing; LIU, Xujie; HE, Wei; HUANG, Qianli; LI, Shengrong; FENG, Qingling. Calcium carbonate nanoparticles promote osteogenesis compared to adipogenesis in human bone-marrow mesenchymal stem cells. **Progress in Natural Science: Materials International**, [S. l.], v. 28, n. 5, p. 598–608, 2018. DOI: 10.1016/j.pnsc.2018.09.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2018.09.004>.

LI, Zelun; AI, Kelong; YANG, Zhe; ZHANG, Tianqi; LIU, Jianhua; CUI, Xiaoqiang. Untrasmall Bi₂S₃ nanodots for in vivo X-ray CT imaging-guided photothermal therapy of cancer. **RSC Advances**, [S. l.], v. 7, n. 47, p. 29672–29678, 2017. DOI: 10.1039/c7ra04132b.

LIU, Na; TANG, Meng; DING, Jiandong. The interaction between nanoparticles-protein corona complex and cells and its toxic effect on cells. **Chemosphere**, v. 245, p. 125–136 DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125624. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125624>.

LIU, Shuyu; YIN, Nuoya; FAIOLA, Francesco. Prospects and Frontiers of Stem Cell Toxicology. **Stem Cells and Development**, [S. l.], v. 26, n. 21, p. 1528–1539, 2017. DOI: 10.1089/scd.2017.0150.

LIU, Wenwei; DENG, Yaguang; LIU, Ying; GONG, Wenrong; DENG, Wnebin. Stem Cell Models for Drug Discovery and Toxicology Studies. **J Biochem Molecular Toxicology**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 17–27, 2013. DOI: 10.1002/jbt.

LIU, Yongming et al. Autophagy associated cytotoxicity and cellular uptake mechanisms of bismuth nanoparticles in human kidney cells. **Toxicology Letters**, [S. l.], v. 275, n. April, p. 39–48, 2017. DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.04.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.04.014>.

LU, Shu Ting et al. Single-Component Bismuth Nanoparticles as a Theranostic Agent for Multimodal Imaging-Guided Glioma Therapy. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 17, p. 619–627, 2019. DOI: 10.1016/j.csbj.2019.04.005.

LUZ, Jessica Zablocki; MACHADO, Thiago Neves; BEZERRA, Arandi Ginane; DE OLIVEIRA RIBEIRO, Ciro Alberto; NETO, Francisco Filipak. Cytotoxicity of bismuth nanoparticles in the murine macrophage cell line RAW 264.7. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [S. l.], v. 31, n. 11, 2020. DOI: 10.1007/s10856-020-06427-0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-020-06427-0>.

MAHBUBUL, I. M. **Stability and Dispersion Characterization of Nanofluid**. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1016/b978-0-12-813245-6.00003-4.

MALAKAR, Arindam; KANEL, Sushil R.; RAY, Chittaranjan; SNOW, Daniel D.; NADAGOUDA, Mallikarjuna N. Nanomaterials in the environment, human exposure pathway, and health effects: A review. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 759, p. 143470, 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.143470. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143470>.

MANCUSO, Luisa; CAO, Giacomo. Acute toxicity test of CuO nanoparticles using human mesenchymal stem cells. **Toxicology Mechanisms and Methods**, [S. l.], v. 24, n. 7, p. 449–454, 2014. DOI: 10.3109/15376516.2014.928920.

MARCHI, Saverio et al. Mitochondria-Ros Crosstalk in the Control of Cell Death and Aging. **Journal of Signal Transduction**, [S. l.], v. 2012, p. 1–17, 2012. DOI: 10.1155/2012/329635.

MARCON, Bruna H. et al. Downregulation of the protein synthesis machinery is a major regulatory event during early adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. **Stem Cell Research**, [S. l.], v. 25, p. 191–201, 2017. DOI: 10.1016/j.scr.2017.10.027. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.10.027>.

MOHAJERANI, Abbas; BURNETT, Lucas; SMITH, John V.; KURMUS, Halenur; MILAS, John; ARULRAJAH, Arul; HORPIBULSUK, Suksun; KADIR, Aeslina Abdul. Nanoparticles in construction materials and other applications, and implications of nanoparticle use. **Materials**, [S. l.], v. 12, n. 19, p. 1–25, 2019. DOI: 10.3390/ma12193052.

MOHAMMADNIAEI, Mohsen; YOON, Jinho; LEE, Taek; BHARATE, Bapurao G.; JO, Jinhee; LEE, Donghyun; CHOI, Jeong Woo. Electrochemical Biosensor Composed of Silver Ion-Mediated dsDNA on Au-Encapsulated Bi₂Se₃ Nanoparticles for the Detection of H₂O₂ Released from Breast Cancer Cells. **Small**, [S. l.], v. 14, n. 16, p. 1–13, 2018. DOI: 10.1002/smll.201703970.

MORI, Hideki; HARA, Masayuki. Cultured stem cells as tools for toxicological assays. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 116, n. 6, p. 647–652, 2013. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.05.028. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.05.028>.

MOURDIKOUDIS, Stefanos; PALLARES, Roger M.; THANH, Nguyen T. K. Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. **Nanoscale**, [S. l.], v. 10, n. 27, p. 12871–12934, 2018. a. DOI: 10.1039/c8nr02278j.

MURGIA, Antonio; MANCUSO, Luisa; MANIS, Cristina; CABONI, Pierluigi; CAO, Giacomo. GC-MS metabolomics analysis of mesenchymal stem cells treated with copper oxide nanoparticles. **Toxicology Mechanisms and Methods**, [S. l.], v. 26, n. 8, p. 611–619, 2016. DOI: 10.1080/15376516.2016.1220654.

MUSAZZI, Umberto M.; MARINI, Valentina; CASIRAGHI, Antonella; MINGHETTI, Paola. Is the European regulatory framework sufficient to assure the safety of citizens using health products containing nanomaterials? **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 22, n. 6, p. 870–882, 2017. DOI: 10.1016/j.drudis.2017.01.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2017.01.016>.

MUTHUMARIYAPPAN, Akilarasan; RAJAJI, Umamaheswari; CHEN, Shen Ming; CHEN, Tse Wei; LI, Yi Ling; RAMALINGAM, R. Jothi. One-pot sonochemical synthesis of Bi₂WO₆ nanospheres with multilayer reduced graphene nanosheets modified electrode as rapid electrochemical sensing platform for high sensitive detection of

oxidative stress biomarker in biological sample. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S. l.], v. 57, n. January, p. 233–241, 2019. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2019.04.011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.04.011>.

NAE, S.; BORDEIANU, I.; STANCIOIU, A.; ANTOHI, N. Human adipose-derived stem cells: definition, isolation, tissue-engineering applications. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, [S. l.], v. 54, n. 4, p. 919–924, 2013.

NAJI, Abderrahim; EITOKU, Masamitsu; FAVIER, Benoit; DESCHASEAUX, Frédéric; ROUAS-FREISS, Nathalie; SUGANUMA, Narufumi. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 76, n. 17, p. 3323–3348, 2019. DOI: 10.1007/s00018-019-03125-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03125-1>.

NATIONAL SCIENCE AND TECHNOLOGY COUNCIL. The National Nanotechnology Initiative—Supplement to the President's 2021 Budget. **Supplement to the President's 2021 Budget**, [S. l.], n. October, 2020.

NAVYA, P. N.; DAIMA, Hemant Kumar. Rational engineering of physicochemical properties of nanomaterials for biomedical applications with nanotoxicological perspectives. **Nano Convergence**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1–14, 2016. DOI: 10.1186/s40580-016-0064-z.

NAZARI, P.; DOWLATABADI-BAZAZ, R.; MOFID, M. R.; POURMAND, M. R.; DARYANI, N. E.; FARAMARZI, M. A.; SEPEHRIZADEH, Z.; SHAHVERDI, A. R. The antimicrobial effects and metabolomic footprinting of carboxyl-capped bismuth nanoparticles against helicobacter pylori. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 172, n. 2, p. 570–579, 2014. DOI: 10.1007/s12010-013-0571-x.

NIGOVIĆ, Biljana; JURIC, Sandra; MITROVIĆ, Iva. Bismuth nanoparticles-carbon nanotubes modified sensor for sulfasalazine analysis. **Talanta**, [S. l.], v. 164, p. 201–208, 2017. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.11.059. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.11.059>.

NIU, Chenguang; YUAN, Keyong; MA, Rui; GAO, Li; JIANG, Wenxin; HU, Xuchen; LIN, Wenzhen; ZHANG, Xiaoling; HUANG, Zhengwei. Gold nanoparticles promote osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via the p38 MAPK signaling pathway. **Molecular Medicine Reports**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 4879–4886, 2017. DOI: 10.3892/mmr.2017.7170.

PATEL, Suprava; NANDA, Rachita. Nanotechnology in Healthcare: Applications and Challenges. **Medicinal chemistry**, [S. l.], v. 05, n. 12, 2015. DOI: 10.4172/2161-0444.1000312.

PISCOPO, Marcos Roberto; KNISS, Cláudia Terezinha; BIANCOLINO, César Augusto; TEIXEIRA, Claudia Echevengua. O setor brasileiro de nanotecnologia: Oportunidades e desafios. **Revista de Negócios**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 43, 2015. DOI: 10.7867/1980-4431.2014v19n4p43-63.

PITTENGER, Mark F.; DISCHER, Dennis E.; PÉAULT, Bruno M.; PHINNEY, Donald

G.; HARE, Joshua M.; CAPLAN, Arnold I. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. **npj Regenerative Medicine**, [S. l.], v. 4, n. 1, 2019. DOI: 10.1038/s41536-019-0083-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41536-019-0083-6>.

POST, Yorick; CLEVERS, Hans. Defining Adult Stem Cell Function at Its Simplest: The Ability to Replace Lost Cells through Mitosis. **Cell Stem Cell**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 174–183, 2019. DOI: 10.1016/j.stem.2019.07.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.07.002>.

PRABHA, Shashi; ARYA, Geeta; CHANDRA, Ramesh; AHMED, Bahar; NIMESH, Surendra. Effect of size on biological properties of nanoparticles employed in gene delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 83–91, 2016. DOI: 10.3109/21691401.2014.913054.

PYATRIKAS, Darya V.; FEDOSEEVA, Irina V.; VARAKINA, Nina N.; RUSALEVA, Tatyana M.; STEPANOV, Alexei V.; FEDYAEVA, Anna V.; BOROVSKII, Gennadii B.; RIKHVANOV, Eugene G. Relation between cell death progression, reactive oxygen species production and mitochondrial membrane potential in fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells under heat-shock conditions. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], v. 362, n. 12, p. 1–8, 2015. DOI: 10.1093/femsle/fnv082.

RAI, Yogesh; PATHAK, Richa; KUMARI, Neeraj; SAH, Dhananjay Kumar; PANDEY, Sanjay; KALRA, Namita; SONI, Ravi; DWARAKANATH, B. S.; BHATT, Anant Narayan. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-19930-w. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19930-w>.

REUS, Thamile Luciane; MACHADO, Thiago Neves; BEZERRA, Arandi Ginane; MARCON, Bruna Hilzendege; PASCHOAL, Ariane Caroline Campos; KULIGOVSKI, Crisciele; DE AGUIAR, Alessandra Melo; DALLAGIOVANNA, Bruno. Dose-dependent cytotoxicity of bismuth nanoparticles produced by LASiS in a reference mammalian cell line BALB/c 3T3. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 53, n. June, p. 99–106, 2018. DOI: 10.1016/j.tiv.2018.07.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.07.003>.

RIBEIRO, A. R. et al. Challenges on the toxicological predictions of engineered nanoparticles. **NanoImpact**, [S. l.], v. 8, p. 59–72, 2017. DOI: 10.1016/j.impact.2017.07.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.impact.2017.07.006>.

ROBERT, Anny W.; MARCON, Bruna H.; DALLAGIOVANNA, Bruno; SHIGUNOV, Patrícia. Adipogenesis, Osteogenesis, and Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells: A Comparative Transcriptome Approach. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [S. l.], v. 8, n. July, 2020. DOI: 10.3389/fcell.2020.00561.

ROSEN, Evan D.; MACDOUGALD, Ormond A. Adipocyte differentiation from the inside out. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 7, n. 12, p. 885–896, 2006. DOI: 10.1038/nrm2066.

RUDMANN, Daniel G. On-target and off-target-based toxicologic effects. **Toxicologic Pathology**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 310–314, 2013. DOI: 10.1177/0192623312464311.

SADROLHOSSEINI, Amir; ADZIR MAHDI, Mohd; ALIZADEH, Farideh; ABDUL RASHID, Suraya. Laser Ablation Technique for Synthesis of Metal Nanoparticle in Liquid. **Laser Technology and its Applications**, [S. l.], 2019. DOI: 10.5772/intechopen.80374.

SAEED, Ayman Ali; SÁNCHEZ, Josep Lluís Acero; O’SULLIVAN, Ciara K.; ABBAS, Mohammed Nooredeen. DNA biosensors based on gold nanoparticles-modified graphene oxide for the detection of breast cancer biomarkers for early diagnosis. **Bioelectrochemistry**, [S. l.], v. 118, n. 2016, p. 91–99, 2017. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2017.07.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.07.002>.

SAEI, Amir Ata et al. Nanoparticle Surface Functionality Dictates Cellular and Systemic Toxicity. **Chemistry of Materials**, [S. l.], v. 29, n. 16, p. 6578–6595, 2017. DOI: 10.1021/acs.chemmater.7b01979.

SAJID, Muhammad; PŁOTKA-WASYLKA, Justyna. Nanoparticles: Synthesis, characteristics, and applications in analytical and other sciences. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 154, n. November 2019, p. 104623, 2020. DOI: 10.1016/j.microc.2020.104623. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104623>.

SCANU, M.; MANCUSO, L.; CAO, G. Evaluation of the use of human Mesenchymal Stem Cells for acute toxicity tests. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 25, n. 8, p. 1989–1995, 2011. DOI: 10.1016/j.tiv.2011.07.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.07.006>.

SCHULZ, Peter A. Há mais história lá embaixo - um convite para rever uma palestra. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 40, 2018.

SENGSTOCK, Christina; DIENDORF, Jörg; EPPLE, Matthias; SCHILDHAUER, Thomas A.; KÖLLER, Manfred. Effect of silver nanoparticles on human mesenchymal stem cell differentiation. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 2058–2069, 2014. DOI: 10.3762/bjnano.5.214.

SEO, Bong Jong; YOON, Sang Hoon; DO, Jeong Tae. Mitochondrial dynamics in stem cells and differentiation. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 12, 2018. DOI: 10.3390/ijms19123893.

SHAHBAZI, Mohammad Ali; FAGHFOURI, Leila; FERREIRA, Mónica P. A.; FIGUEIREDO, Patrícia; MALEKI, Hajar; SEFAT, Farshid; HIRVONEN, Jouni; SANTOS, Hélder A. The versatile biomedical applications of bismuth-based nanoparticles and composites: Therapeutic, diagnostic, biosensing, and regenerative properties. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], v. 49, n. 4, p. 1253–1321, 2020. DOI: 10.1039/c9cs00283a.

SHAKIBAIE, Mojtaba; AMIRI-MOGHADAM, Parinaz; GHAZANFARI, Mehran; ADELI-

SARDOU, Mahboubeh; JAFARI, Mandana; FOROOTANFAR, Hamid. Cytotoxic and antioxidant activity of the biogenic bismuth nanoparticles produced by *Delftia* sp. SFG. **Materials Research Bulletin**, [S. l.], v. 104, n. April, p. 155–163, 2018. DOI: 10.1016/j.materresbull.2018.04.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2018.04.001>.

SIBUYI, Nicole Remaliah Samantha; MOABELO, Koena Leah; MEYER, Mervin; ONANI, Martin Opiyo; DUBE, Admire; MADIEHE, Abram Madimabe. Nanotechnology advances towards development of targeted-treatment for obesity. **Journal of Nanobiotechnology**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–21, 2019. DOI: 10.1186/s12951-019-0554-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0554-3>.

SINGH, Namita Ashish. Nanotechnology innovations, industrial applications and patents. **Environmental Chemistry Letters**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 185–191, 2017. DOI: 10.1007/s10311-017-0612-8.

SOENEN, Stefaan J.; PARAK, Wolfgang J.; REJMAN, Joanna; MANSHIAN, Bella. (Intra)cellular stability of inorganic nanoparticles: Effects on cytotoxicity, particle functionality, and biomedical applications. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 115, n. 5, p. 2109–2135, 2015. DOI: 10.1021/cr400714j.

SONG, Yilin; WANG, Yidan; WANG, Siyu; CHENG, Yu; LU, Qianglan; YANG, Lifang; TAN, Fengping; LI, Nan. Immune-adjuvant loaded Bi₂Se₃ nanocage for photothermal-improved PD-L1 checkpoint blockade immune-tumor metastasis therapy. **NanoResearch**, v. 12, n. 8, p. 1770–1780, 2019.

SPANGENBERG, Lucia et al. Polysome profiling shows extensive posttranscriptional regulation during human adipocyte stem cell differentiation into adipocytes. **Stem Cell Research**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 902–912, 2013. DOI: 10.1016/j.scr.2013.06.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2013.06.002>.

SPORTELLI, Maria Chiara; IZZI, Margherita; VOLPE, Annalisa; CLEMENTE, Maurizio; PICCA, Rosaria Anna; ANCONA, Antonio; LUGARÀ, Pietro Mario; PALAZZO, Gerardo; CIOFFI, Nicola. The pros and cons of the use of laser ablation synthesis for the production of silver nano-antimicrobials. **Antibiotics**, [S. l.], v. 7, n. 3, 2018. DOI: 10.3390/antibiotics7030067.

STARK, Wendelin J.; STOESSEL, Philipp R.; WOHLLEBEN, Wendel; HAFNER, Andreas. Industrial applications of nanoparticles. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], v. 44, n. 16, p. 5793–5805, 2015. DOI: 10.1039/c4cs00362d. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C4CS00362D>.

STECHSCHULTE, Lance; LECKA-CZERNIK, Beata. Reciprocal regulation of PPAR γ and RUNX2 activities in marrow mesenchymal stem cells: Fine balance between p38 MAPK and Protein Phosphatase 5. **Physiology & behavior**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 107–113, 2017. DOI: 10.1007/s40610-017-0056-8. Reciprocal.

STEWART, Callum; KONSTANTINOV, Konstantin; MCKINNON, Sally; GUATELLI, Susanna; LERCH, Michael; ROSENFELD, Anatoly; TEHEI, Moeava; CORDE, Stéphanie. First proof of bismuth oxide nanoparticles as efficient radiosensitisers on

highly radioresistant cancer cells. **Physica Medica**, [S. l.], v. 32, n. 11, p. 1444–1452, 2016. DOI: 10.1016/j.ejmp.2016.10.015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmp.2016.10.015>.

SUKHANOVA, Alyona; BOZROVA, Svetlana; SOKOLOV, Pavel; BERESTOVOY, Mikhail; KARAULOV, Alexander; NABIEV, Igor. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. **Nanoscale Research Letters**, [S. l.], v. 13, 2018. DOI: 10.1186/s11671-018-2457-x.

TAKAHASHI, Kazutoshi; TANABE, Koji; OHNUKI, Mari; NARITA, Megumi; ICHISAKA, Tomoko; TOMODA, Kiichiro; YAMANAKA, Shinya. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. **Cell**, [S. l.], v. 131, n. 5, p. 861–872, 2007. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019.

TEULON, Jean Marie et al. On the operational aspects of measuring nanoparticle sizes. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2019. DOI: 10.3390/nano9010018.

TONTONOZ, Peter; SPIEGELMAN, Bruce M. Fat and beyond: The diverse biology of PPAR γ . **Annual Review of Biochemistry**, [S. l.], v. 77, p. 289–312, 2008. DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829.

TORRISI, L.; SILIPIGNI, L.; RESTUCCIA, N.; CUZZOCREA, S.; CUTRONEO, M.; BARRECA, F.; FAZIO, B.; DI MARCO, G.; GUGLIELMINO, S. Laser-generated bismuth nanoparticles for applications in imaging and radiotherapy. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, [S. l.], v. 119, n. February, p. 62–70, 2018. DOI: 10.1016/j.jpics.2018.03.034. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpics.2018.03.034>.

TSOU, Yung Hao; WANG, Bin; HO, William; HU, Bin; TANG, Pei; SWEET, Sydney; ZHANG, Xue Qing; XU, Xiaoyang. Nanotechnology-Mediated Drug Delivery for the Treatment of Obesity and Its Related Comorbidities. **Advanced Healthcare Materials**, [S. l.], v. 8, n. 12, 2019. DOI: 10.1002/adhm.201801184.

VAN MEERLOO, Johan; KASPERS, Gertjan J. L.; CLOOS, Jacqueline. Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Methods in Molecular Biology**, [S. l.], v. 731, p. 237–245, 2011. DOI: 10.1385/1592594069.

VANCE, Marina E.; KUIKEN, Todd; VEJERANO, Eric P.; MCGINNIS, Sean P.; JR, Michael F. Hochella; REJESKI, David; HULL, Matthew S. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, p. 1769–1780, 2015. DOI: 10.3762/bjnano.6.181.

VINKEN, Mathieu; BLAAUBOER, Bas J. In vitro testing of basal cytotoxicity: Establishment of an adverse outcome pathway from chemical insult to cell death. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 39, p. 104–110, 2017. a. DOI: 10.1016/j.tiv.2016.12.004.

VINKEN, Mathieu; BLAAUBOER, Bas J. In vitro testing of basal cytotoxicity: Establishment of an adverse outcome pathway from chemical insult to cell death. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 39, p. 104–110, 2017. b. DOI: 10.1016/j.tiv.2016.12.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2016.12.004>.

WEISSMAN, Irving L. Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell**, [S. l.], v. 100, n. 1, p. 157–168, 2000. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81692-X.

WILSCHEFSKI, Scott C.; BAXTER, Matthew R. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry : Introduction to Analytical Aspects. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 40, n. 3, p. 115–133, 2019. DOI: 10.33176/AACB-19-00024. Disponível em: <https://doi.org/10.33176/AACB-19-00024>.

XU, Yan; HADJIARGYROU, M.; RAFAILOVICH, Miriam; MIRONAVA, Tatsiana. Cell - based cytotoxicity assays for engineered nanomaterials safety screening : exposure of adipose derived stromal cells to titanium dioxide nanoparticles. **Journal of Nanobiotechnology**, [S. l.], v. 15, n. 50, p. 1–17, 2017. DOI: 10.1186/s12951-017-0285-2.

YANG, Hui; LIU, Chao; YANG, Danfeng; ZHANG, Huashan; XI, Zhuge. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: The role of particle size, shape and composition. **Journal of Applied Toxicology**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 69–78, 2009. DOI: 10.1002/jat.1385.

YANG, Xing; LIU, Xujie; LI, Yuanyuan; HUANG, Qianli; HE, Wei; ZHANG, Ranran; FENG, Qingling; BENAYAHU, Dafna. The negative effect of silica nanoparticles on adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Materials Science and Engineering C**, [S. l.], v. 81, n. July, p. 341–348, 2017. DOI: 10.1016/j.msec.2017.07.042.

YU, Zhongjie; LI, Qi; WANG, Jing; YU, Yali; WANG, Yin; ZHOU, Qihui; LI, Peifeng. Reactive Oxygen Species-Related Nanoparticle Toxicity in the Biomedical Field. **Nanoscale Research Letters**, [S. l.], v. 15, n. 1, 2020. DOI: 10.1186/s11671-020-03344-7.

YUAN, Jing Ping et al. Quantum dots-based quantitative and in situ multiple imaging on Ki67 and cytokeratin to improve Ki67 assessment in breast cancer. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 1–17, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0122734.

YUAN, Long; QI, Xiaowei; QIN, Gaoping; LIU, Qi; ZHANG, Fan; SONG, Yong; DENG, Jun. Effects of gold nanostructures on differentiation of mesenchymal stem cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 184, n. September, 2019. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110494.

ZHANG, Jiaxin; LIU, Yuzhe; CHEN, Yutong; YUAN, Lei; LIU, He; WANG, Jincheng; LIU, Qiran; ZHANG, Yan. Adipose-Derived Stem Cells: Current Applications and Future Directions in the Regeneration of Multiple Tissues. **Stem Cells International**, [S. l.], v. 2020, 2020. DOI: 10.1155/2020/8810813.

ZHOU, Xu; YUAN, Long; WU, Chengzhou; CHEN, Cheng; LUO, Gaoxing; DENG, Jun; MAO, Zhengwei. Recent review of the effect of nanomaterials on stem cells. **RSC Advances**, [S. l.], v. 8, n. 32, p. 17656–17676, 2018. DOI: 10.1039/c8ra02424c.

ZIELIŃSKA, Aleksandra et al. Nanotoxicology and nanosafety: Safety-by-design and

testing at a glance. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S. l.], v. 17, n. 13, p. 1–22, 2020. DOI: 10.3390/ijerph17134657.

ZOROVA, L. D.; POPKOV, V. A.; PLOTNIKOV, E. J.; SILACHEV, D. N.; PEVZNER, I. B.; JANKAUSKAS, S. S.; ZOROV, S. D.; BABENKO, V. A.; ZOROV, D. B. Functional Significance of the Mitochondrial Membrane Potential. **Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 20–26, 2018. a. DOI: 10.1134/S1990747818010129.

ZOROVA, Ljubava D. et al. Mitochondrial membrane potential. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 552, p. 50–59, 2018. b. DOI: 10.1016/j.ab.2017.07.009.

APÊNDICE 1 – DESCRIÇÃO COMPLETA DO SETUP EMPREGADO PARA AS SÍNTESES DE BiNPs E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Tabela contendo a descrição completa dos parâmetros empregados para produção de cada lote de BiNPs pelo laboratório FotoNanoBio da UTFPR.

DATA	LOTE	PARÂMETROS DE SÍNTESE			CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA					OBS. ⁴
		POT. ¹	FREQ. ²	TEMPO	UV/VIS	CONC. ³	DLS	MET	ZETA	
10/04/19	BiNP_1	4 watts	1.6 KHz	10 min	250 nm	0.7 mg/ml	70 nm	-	-	Degradação
14/05/19	BiNP_2	4 watts	1.6 KHz	12 min	247 nm	1.7 mg/ml	65 nm	-	-	Degradação
28/06/19	BiNP_3	4 watts	1.6 KHz	15 min	215 nm	0.7 mg/ml	50 nm	-	-	Degradação
28/06/19	BiNP_4	4 watts	1.6 KHz	15 min	220 nm	1.1 mg/ml	60 nm	-	-	Degradação
10/07/19	BiNP_5	4 watts	1.6 KHz	15 min	250 nm	1 mg/ml	150 nm	-	-	Degradação
10/07/19	BiNP_6	4 watts	1.6 KHz	15 min	250 nm	1 mg/ml	170 nm	-	-	Degradação
16/08/19	BiNP_7	4 watts	1.6 KHz	15 min	230 nm	1 mg/ml	60 nm	-	-	Degradação
16/08/19	BiNP_8	4 watts	1.6 KHz	15 min	235 nm	1 mg/ml	110 nm	-	-	Degradação
14/11/19	BiNP_9	5 watts	1.4 KHz	5 min	260 nm	0.71 mg/ml	105 nm	-	-3.97 mV	Degradação
14/11/19	BiNP_10	5 watts	1.4 KHz	5 min	265 nm	0.72 mg/ml	100 nm	15 nm	-	Analisadas
14/11/19	BiNP_11	5 watts	1.4 KHz	5 min	270 nm	0.7 mg/ml	70 nm	5 nm	-	Analisadas
31/01/20	BiNP_12	5 watts	1.4 KHz	5 min	270 nm	0.61 mg/ml	57 nm	15 nm	-	Analisadas
31/01/20	BiNP_13	5 watts	1.4 KHz	5 min	270 nm	0.69 mg/ml	47 nm	10 nm	-	Analisadas
31/01/20	BiNP_14	5 watts	1.4 KHz	5 min	270 nm	0.69 mg/ml	56 nm	10 nm	-	Analisadas
31/01/20	BiNP_15	5 watts	1.4 KHz	5 min	268 nm	0.66 mg/ml	62 nm	5 nm	-	Analisadas
21/02/20	BiNP_16	5 watts	1.4 KHz	5 min	270 nm	0.76 mg/ml	75 nm	15 nm	-8.55 mV	Analisadas
21/02/20	BiNP_17	5 watts	1.4 KHz	5 min	270 nm	0.64 mg/ml	60 nm	10 nm	-3.72 mV	Analisadas
21/02/20	BiNP_18	5 watts	1.4 KHz	5 min	270 nm	0.66 mg/ml	70 nm	10 nm	-3.55 mV	Analisadas
16/10/20	BiNP_19	5 watts	1.4 KHz	5 min	265 nm	0.72 mg/ml	60 nm	5 nm	-	Analisadas
16/10/20	BiNP_20	5 watts	1.4 KHz	10 min	285 nm	1.04 mg/ml	60 nm	-	-	Tempo de síntese

Legenda: ¹ Pot. = potência; ²Freq. = frequência; ³Conc. = concentração.

APÊNDICE 2 – ARTIGO PUBLICADO

Toxicology in Vitro 77 (2021) 105248



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxinvit

Bismuth-based nanoparticles impair adipogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells

Annanda Lyra Ribeiro^a, Letícia Werzel Bassai^{a,b}, Anny Waloski Robert^a,
Thiago Neves Machado^c, Arandi Ginane Bezerra Jr^c, Cintia Delai da Silva Horinouchi^{a,*},
Alessandra Melo de Aguiar^{a,d,*}

^a Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco, Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

^b Laboratório de Cultivo de Eucariotos, Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

^c Laboratório FotoNanoBio, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

^d Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ – Bioensaios com Métodos Alternativos em Citotoxicidade, Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Nanoparticles
Bismuth
Stem cells
Cell differentiation

ABSTRACT

Bismuth-based nanoparticles (BiNPs) have attracted attention for their potential biomedical applications. However, there is a lack of information concerning their interaction with biological systems. In this study, it was investigated the effect of physically synthesized BiNPs to human adipose-derived stem cells (ADSCs). We first evaluated the influence of BiNPs on cell viability, cell morphology, mitochondrial function and cell proliferation. Further, the impact of BiNPs on adipogenic differentiation was also explored. Cytotoxicity assays have demonstrated that BiNPs did not reduce relative cell viability of ADSC except at the highest tested concentration (345 µg/ml). Analysis of cell morphology performed by transmission electron microscopy confirmed that BiNPs induced cell damage only at a high concentration (302.24 µg/ml), equivalent to IC₅₀ concentration. Moreover, BiNPs exposure increased the expression of the cell proliferation marker Ki-67 and the incorporation of the thymidine analogue Edu into cell DNA, suggesting that these nanoparticles could be stimulating ADSC proliferation. BiNPs also increased the mitochondrial membrane potential. Furthermore, BiNPs reduced ADSC adipogenic differentiation as measured by lipid droplet accumulation and mRNA expression levels of the specific adipogenesis biomarkers PPAR γ , C/EPB α and FABP4. Thus, BiNPs affect the nonspecific (viability, proliferation and mitochondrial activity) and specific (adipogenesis) cellular mechanisms of ADSCs.

1. Introduction

Nanoparticles (NPs) have many applications in technological, industrial and biomedical fields (Singh, 2017), although the safety assessment of NPs remains a major challenge. As a very heterogeneous class of materials, NPs show high variability in their effects and properties (Fadeel et al., 2018; Khan et al., 2019). Even NPs from the same material can behave differently, reinforcing the indispensability of a carefully planned and executed toxicological analysis (Azhdarzadeh et al., 2015). Among metallic NPs, bismuth-based nanoparticles (BiNPs) have attracted substantial attention for their antifungal, bactericidal and antibiofilm activities (Dalvand et al., 2018; Hernandez-Delgado et al., 2017). Regarding their potential biomedical applications, BiNPs have shown promising results as radiosensitizers (Deng et al., 2018) and

theranostic agents for cancer treatment (Lu et al., 2019). Moreover, they have been applied to the construction of highly sensitive biosensors (Nigović et al., 2017) and to the development of new contrast agents for imaging (Hernández-Rivera et al., 2019; Torrisi et al., 2018). Since interest in the applicability of BiNPs is recent, so far there are no products containing BiNPs currently available on the market (The Project on Emerging Nanotechnology, 2021), and studies regarding BiNP toxicity are still in the early stages (Luz et al., 2020). Thus, toxicity evaluation of BiNPs on human cells is highly recommended before their application in biomedicine (Reus et al., 2018).

Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) have become an alternative model for the toxicity assessment of different chemical substances (Esques et al., 2017), including NPs (Mancuso and Cao, 2014). These adult multipotent cells can be easily isolated from different human sources,

* Corresponding authors at: Instituto Carlos Chagas, Rua Professor Alcayr Munhoz Mader, FIOCRUZ Paraná, 3775, Curitiba, PR 81350-010, Brazil.
E-mail addresses: cintiahorinouchi@yahoo.com (C.D.S. Horinouchi), alessandra.aguiar@fiocruz.br (A.M. Aguiar).

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105248>

Received 11 June 2021; Received in revised form 6 September 2021; Accepted 16 September 2021

Available online 21 September 2021

0887-2333/© 2021 Published by Elsevier Ltd.

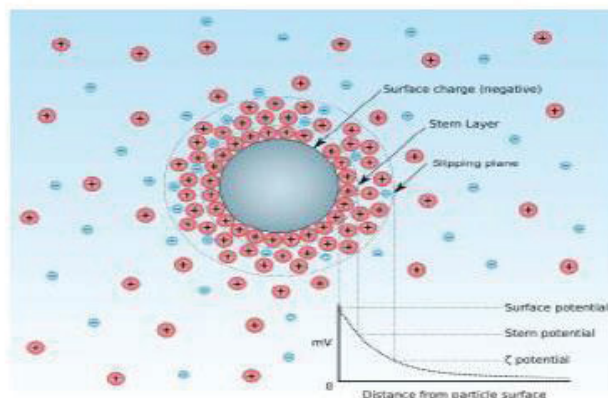
ANEXO 1 – LAUDO DO POTENCIAL ZETA DE BiNPs



Instituto SENAI de Inovação em Eletroquímica	RELATÓRIO TÉCNICO	DOCUMENTO Nº MAT SERV 2020_160
ENDEREÇO SENAI – Campus da Indústria Av. Comendador Franco, 1341, Bairro Jardim Botânico, CEP 00216-000, Curitiba - PR http://www.senai.org.br/instituto-de-inovacao/	DATA DE EMISSÃO 05/10/2020	PÁGINA 2 de 6

1 Introdução

O Potencial zeta é definido como a diferença de voltagem entre a área externa da superfície da partícula dispersa e a área do líquido dispersante. O potencial zeta está relacionado com a carga superficial. Imagine uma suspensão de um sólido finamente dividido e uniformemente distribuído em meio aquoso. Por diferentes mecanismos, essas partículas apresentam uma carga elétrica superficial. Todavia, no meio aquoso, também existem cargas elétricas em razão da presença de íons que interagem eletricamente com as partículas em suspensão. A figura abaixo representa de forma esquemática uma partícula com carga superficial negativa, cujo potencial elétrico em relação a uma superfície de referência pode ser medido em mili Volts (mV).



O Potencial Zeta pode ser medido por um instrumento no qual é inserida uma pequena amostra da suspensão, oferecendo leitura em mV, que pode ser um número positivo ou negativo. O valor medido fornece uma indicação a respeito da estabilidade da suspensão. Suspensões com valores de Potencial Zeta superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV são estáveis, enquanto aquelas cujo valor se situa acima de -30 mV e abaixo de +30 mV são instáveis e podem flocular. Como se percebe, esta propriedade das suspensões permite uma avaliação objetiva sobre o comportamento estável ou não das mesmas.

Os resultados deste Documento são válidos apenas para as amostras ensaiadas no ISI-Eletroquímica. Reproduções deste Documento só têm validade se foram integrais.

DOC - 01

Data: OUT/2020

Revisão: 01

Instituto Senai de Inovação em Eletroquímica



Instituto SENAI de Inovação em Eletroquímica		RELATÓRIO TÉCNICO	DOCUMENTO Nº MAT SERV 2020_160
ENDEREÇO SENAI – Campus da Indústria Av. Comendador Franco, 1341, Bairro Jardim Botânico, CEP 80216-090, Curitiba - PR http://www.senai.org.br/instituto-de-inovacao/		DATA DE EMISSÃO 05/10/2020	PÁGINA 1 de 6
TÍTULO:	Avaliação de estabilidade de amostras diversas		
OBJETO/ESCOPO:	Análise de Potencial Zeta de 4 amostras		
PROPOSTA COMERCIAL nº:	ISI EQ 28072020		
SOLICITANTE/DESTINATÁRIO:	Alessandra Mello de Aguiar (41) 2104-3231		
NÚMERO DE ANEXOS:	<input checked="" type="checkbox"/> SERV Serviços Tecnológicos <input type="checkbox"/> CONS Consultoria <input type="checkbox"/> PROJ Projetos <input type="checkbox"/> OUTROS Especificar:		
EQUIPE TÉCNICA:	RESPONSÁVEL TÉCNICO:		
Agne Roani de Carvalho Jorge	 Marcos Berton CRQ-09200903 E-mail: marcos.berton@sistemafiep.org.br Telefone: (41) 3271-7868 / (41) 99957-0581		

Os resultados deste Documento são válidos apenas para as amostras ensaiadas no ISI-Eletroquímica. Reproduções deste Documento só têm validade se forem integrais.

DOC - 01 Data: OUT/2020 Revisão: 01 Instituto Senai de Inovação em Eletroquímica



Instituto SENAI de Inovação em Eletroquímica	RELATÓRIO TÉCNICO	DOCUMENTO Nº MAT SERV 2020_160
<small>ENDEREÇO</small> SENAI – Campus da Indústria Av. Comendador Franco, 1341, Bairro Jardim Botânico, CEP 00215-090, Curitiba - PR http://www.senai.org.br/instituto-de-inovacao/	<small>DATA DE EMISSÃO</small> 05/10/2020	<small>PÁGINA</small> 3 de 6

2 Metodologia

A análise de potencial zeta foi realizada no equipamento Zeta Potential Analyzer, da marca Brookhaven, modelo Zeta PALS. Neste procedimento, alíquotas das amostras dispersas em água foram dispostas em cubetas de acrílico, conforme recebidas. Em seguida, a cubeta contendo cada amostra foi inserida no porta amostras do equipamento e foi realizada a medida, sendo que os dados foram coletados pelo software BIC Particle Solutions. Em cada medida foram realizadas cinco varreduras, sendo que o resultado final compreende a média destes valores associada ao desvio padrão.

Os resultados deste Documento são válidos apenas para as amostras ensaiadas no ISI-Eletroquímica. Reproduções deste Documento só têm validade se forem integrais.

DOC - 01

Data: OUT/2020

Revisão: 01

Instituto Senai de Inovação em Eletroquímica



Instituto SENAI de Inovação em Eletroquímica	RELATÓRIO TÉCNICO	DOCUMENTO Nº MAT SERV 2020_160
ENDEREÇO SENAI – Campus da Indústria Av. Comendador Franco, 1341, Bairro Jardim Botânico, CEP 80216-090, Curitiba - PR http://www.senai.org.br/instituto-de-inovacao/	DATA DE EMISSÃO 05/10/2020	PÁGINA 4 de 6

3 Resultados

Os resultados da análise de Potencial Zeta estão apresentados nas Figuras 1 a 4. O valor médio de potencial zeta para a amostra BiNPs_02 foi de -8,55 mV, para a amostra BiNPs_03 foi de -3,72 mV, para a amostra BiNPs_04 foi de -3,55 mV e para a amostra BiNPs_05 foi de -3,97 mV.

Type	Start Date/Time	Sample ID	Zeta Potential (mV)	Mobility (µs/(V/cm))	RMS Residual
FALS	10/09/2020 15:28:23	BiNPs_2_Flo Cruz - 5	-9,57	-0,75	1,5898e-02
FALS	10/09/2020 15:17:45	BiNPs_2_Flo Cruz - 4	-9,98	-0,78	1,9809e-02
FALS	10/09/2020 15:17:08	BiNPs_2_Flo Cruz - 3	-7,52	-0,59	1,7603e-02
FALS	10/09/2020 15:26:30	BiNPs_2_Flo Cruz - 2	-7,18	-0,55	3,4299e-02
FALS	10/09/2020 15:25:53	BiNPs_2_Flo Cruz - 1	-6,51	-0,67	5,1955e-02
		Mean:	-8,55	-0,57	2,8113e-02
		Std Err:	0,55	0,04	6,7524e-03
		Std Dev:	1,23	0,10	1,5099e-02

Figura 1. Resultados de potencial zeta da amostra BiNPs_02

Type	Start Date/Time	Sample ID	Zeta Potential (mV)	Mobility (µs/(V/cm))	RMS Residual
FALS	10/09/2020 14:54:58	BiNPs_3_Flo Cruz - 5	-3,42	-0,27	2,6602e-02
FALS	10/09/2020 14:54:21	BiNPs_3_Flo Cruz - 4	-2,94	-0,23	2,7991e-02
FALS	10/09/2020 14:53:43	BiNPs_3_Flo Cruz - 3	-3,64	-0,28	2,5472e-02
FALS	10/09/2020 14:53:06	BiNPs_3_Flo Cruz - 2	-4,31	-0,34	3,3809e-02
FALS	10/09/2020 14:52:20	BiNPs_3_Flo Cruz - 1	-4,28	-0,33	2,1152e-02
		Mean:	-3,72	-0,29	2,7005e-02
		Std Err:	0,26	0,02	2,9502e-03
		Std Dev:	0,59	0,05	4,5844e-03

Figura 2. Resultados de potencial zeta da amostra BiNPs_03

Os resultados deste Documento são válidos apenas para as amostras ensaiadas no ISI-Eletroquímica. Reproduções deste Documento só têm validade se forem integrais.



Instituto SENAI de Inovação em Eletroquímica	RELATÓRIO TÉCNICO	DOCUMENTO Nº MAT SERV 2020_160
ENDEREÇO SENAI – Campus da Indústria Av. Comendador Franco, 1341, Bairro Jardim Botânico, CEP 00215-090, Curitiba - PR http://www.senai.org.br/instituto-de-inovacao/	DATA DE EMISSÃO 05/10/2020	PÁGINA 5 de 6

Type	Start Date/Time	Sample ID	Zeta Potential (mV)	Mobility ($\mu\text{m}^2/\text{Vs/cm}$)	RMS Residual
PALS	10/09/2020 15:21:55	BiNPs_4_Rio Cruz - 5	-2,51	-0,20	1,5459e-02
PALS	10/09/2020 15:21:18	BiNPs_4_Rio Cruz - 4	-3,23	-0,25	2,4577e-02
PALS	10/09/2020 15:20:40	BiNPs_4_Rio Cruz - 3	-3,29	-0,26	3,8976e-02
PALS	10/09/2020 15:20:03	BiNPs_4_Rio Cruz - 2	-5,77	-0,45	2,7344e-02
PALS	10/09/2020 15:19:25	BiNPs_4_Rio Cruz - 1	-2,95	-0,23	1,4364e-02
		Mean:	-3,55	-0,28	2,3744e-02
		Std Err:	0,57	0,04	4,1559e-03
		Std Dev:	1,28	0,10	5,2921e-03

Figura 3. Resultados de potencial zeta da amostra BiNPs_04

Type	Start Date/Time	Sample ID	Zeta Potential (mV)	Mobility ($\mu\text{m}^2/\text{Vs/cm}$)	RMS Residual
PALS	11/09/2020 14:24:25	BiNPs_5_Rio Cruz - 5	-4,03	-0,32	1,8873e-02
PALS	11/09/2020 14:23:48	BiNPs_5_Rio Cruz - 4	-3,95	-0,31	1,5901e-02
PALS	11/09/2020 14:23:11	BiNPs_5_Rio Cruz - 3	-3,77	-0,29	1,9494e-02
PALS	11/09/2020 14:22:34	BiNPs_5_Rio Cruz - 2	-4,82	-0,38	8,9458e-03
PALS	11/09/2020 14:21:57	BiNPs_5_Rio Cruz - 1	-3,25	-0,25	2,0470e-02
		Mean:	-3,67	-0,31	1,6719e-02
		Std Err:	0,25	0,02	2,0356e-03
		Std Dev:	0,57	0,04	4,8638e-03

Figura 4. Resultados de potencial zeta da amostra BiNPs_05

Os resultados deste Documento são válidos apenas para as amostras ensaiadas no ISI-Eletroquímica. Reproduções deste Documento só têm validade se forem integrais.

DOC - 01

Data: OUT/2020

Revisão: 01

Instituto Senai de Inovação em Eletroquímica



Instituto SENAI de Inovação em Eletroquímica	RELATÓRIO TÉCNICO	DOCUMENTO Nº MAT SERV 2020_160
ENDEREÇO SENAI – Campus da Indústria Av. Comendador Franco, 1341, Bairro Jardim Botânico, CEP 80215-090, Curitiba - PR http://www.senalpr.org.br/instituto-de-inovacao/	DATA DE EMISSÃO 05/10/2020	PÁGINA 6 de 6

4 Conclusão

A interpretação dos resultados é de responsabilidade do solicitante.

* * *