



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS
APLICADAS A ANIMAIS DE INTERESSE REGIONAL**

FRANCISCA LOUENNY ALVES CARDOSO

**CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DA LAPONITA EM
CULTURAS DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

**TERESINA-PI
2023**

FRANCISCA LOUENNY ALVES CARDOSO

**CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DA LAPONITA EM
CULTURAS DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional, da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Linha de pesquisa: Biotecnologia, Reprodução e Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho.

**TERESINA- PI
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial CCA
Serviço de Representação Temática da Informação

C268c Cardoso, Francisca Louenny Alves.
Citotoxicidade e genotoxicidade da laponita em culturas de células-tronco mesenquimais / Francisca Louenny Alves Cardoso. -- 2023.
71 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional, 2023.
“Orientadora: Profa. Dr^a. Maria Acelina Martins de Carvalho.”

1. Células-tronco mesenquimais. 2. Laponita. 3. *Scaffold*. 4. Toxicidade. 5. Osteogênese. I. Carvalho, Maria Acelina Martins de. II. Título.

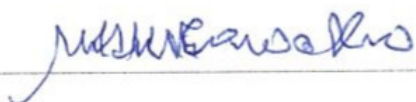
CDD 575.01

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

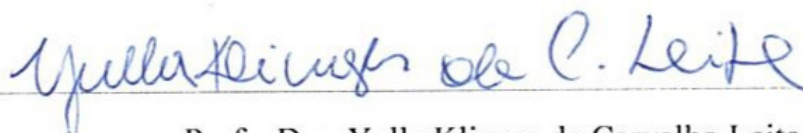
CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DA LAPONITA EM CULTURAS DE
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

FRANCISCA LOUENNY ALVES CARDOSO

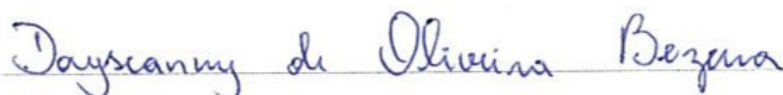
BANCA EXAMINADORA:



Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho
(Presidente) / CCA / UFPI



Profa. Dra. Yulla Klinger de Carvalho Leite
(Examinadora externa) / CSHNB / UFPI



Profa. Dra. Dayseanny de Oliveira Bezerra
(Examinadora interna) / IFPI

*Dedico,
Ao Pai celestial por toda a força
A minha família por ser meu pilar
Ao meu amor, Felipe, por todo apoio*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado, me dado força, luz, saúde e discernimento que me concebeu para encarar esse período de mestrado em meio a uma pandemia e não ter me deixado desistir.

A minha família por sempre me incentivar a continuar e por ser minha maior base nos momentos de dificuldade, em especial minha mãe Luzilene, que mesmo distante é minha maior incentivadora. Eu não teria conseguido sem vocês!

Ao meu amor, Felipe, que esteve comigo em todos os finais de semanas, feriados, à noite, e em todos os horários que podia me acompanhar, para que eu pudesse concluir meus ensaios sempre em segurança e por me dar apoio em todas as hipóteses. Este trabalho também é seu.

À Universidade Federal do Piauí por toda a oportunidade, pela estrutura, corpo docente e qualificação essencial para minha formação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Prof. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho, pela orientação, dedicação e principalmente pela confiança no meu trabalho, meu muito obrigada aos seus sábios conselhos e por conduzir este trabalho da melhor forma.

Ao prof. Dr. Napoleão Martins Argolo Neto por fazer parte da construção deste trabalho, sempre o instruindo para um melhor desenvolvimento desde o princípio.

Ao prof. Dr. Anderson de Oliveira Lobo por ter fornecido a Laponita[®], um dos principais materiais utilizado neste trabalho, e ao Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAv-UFPI) pelas análises físicas e químicas essenciais na caracterização da Laponita[®].

Ao prof. Dr. Adalberto Socorro da Silva e ao técnico Raimundo pela paciência que tiveram em auxiliar-nos, nas diversas titulações, até acharmos as concentrações ideais de anticorpos nos testes de imunofenotipagem, e ao Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular (LIB-UFPI) onde foi conduzido este experimento.

Ao prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa e a doutoranda Antonielly, pela contribuição na execução do ensaio de genotoxicidade, instruindo na leitura das lâminas e análise estatística, ainda, o Laboratório de Genética Toxicológica (LAPGENIC-UFPI) pela estrutura fornecida para a realização do ensaio.

Aos pós-graduandos do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt), em especial a minha amiga Leticya, por ser uma pessoa incrível e, mesmo frente às dificuldades, sempre foi uma incentivadora e nunca me deixou desistir. A Huanna pelo treinamento inicial do cultivo celular e por diversos conselhos que me foram extremamente úteis nesta jornada. A aluna, Bolsista PIBIC, Maria de Fátima, por ter nos ajudado incontáveis vezes. A todas vocês, minha eterna gratidão.

A doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia dos Materiais, Danielle Benigno, por toda positividade, experiência e por contribuir da melhor maneira e mais didaticamente possível, com todo o conhecimento sobre os materiais.

Aos funcionários do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt), Hermínio José, Técnico do NUPCelt e Maria da Cruz, pela colaboração constante.

Aos animais que fizeram parte deste trabalho e, por ainda serem insubstituíveis nas pesquisas, continuam ajudando aos cientistas e pesquisadores a salvar muitas vidas.

E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho. Gratidão!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá.

RESUMO

As Células-tronco mesenquimais são células indiferenciadas, que constituem ferramenta promissora no campo da medicina regenerativa, pois possuem capacidade de multiplicação mantendo seu estado indiferenciado, além da renovação de diversos tecidos, por meio de sua diferenciação celular. A laponita é uma nanoargila sintética, utilizada em diversas aplicações industriais e possui características que possibilitam sua utilização na engenharia de tecidos. Recentemente, foram publicados estudos que comprovam a capacidade da laponita em induzir a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais *in vitro*, o que a torna um material apropriado para a engenharia de tecidos ósseos. No entanto, pouco se sabe quanto as reações imunológicas desencadeadas por potenciais citotóxicos e genotóxicos que essa interação pode proporcionar. Assim, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a toxicidade em nível celular e genômico, da integração da laponita em culturas de células-tronco adipoderivadas de ratos, sob autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPI, n. 665/21. A caracterização físico-química da Laponita[®] foi realizada por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, análise termogravimétrica, difração de raios X, e micrografias foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura. O material também passou por uma triagem citotóxica por meio do ensaio de letalidade *Artemia salina*. O tecido adiposo foi coletado e as células foram cultivadas a 5% de CO₂ a 37°C. Para caracterização celular foram realizados os testes de morfologia e UFC, além da imunofenotipagem por citometria de fluxo, para os anticorpos CD14, CD45, CD90 e CD105. Ainda, o ensaio de plasticidade celular, mediante indução para diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica, além da avaliação do potencial de diferenciação osteogênica da Laponita[®] presente no meio. As células foram cultivadas com a Laponita[®] em concentrações de 3% e 6% em três tempos distintos para análise de citotoxicidade por MTT. A análise de genotoxicidade foi conduzida por meio do ensaio cometa para avaliar danos e reparos no DNA em células individuais. Na caracterização do material obteve-se resultados semelhantes aos encontrados na literatura, quando se evidencia a estrutura química cristalina e organizada. Nas análises termogravimétricas, a temperatura de degradação mostrou-se em conformidade com dados observados em outros estudos. No relativo à toxicidade, a laponita obteve resultados abaixo da CL₅₀. As células-tronco mesenquimais mostraram-se com morfologia fibroblastóide, e apresentaram os anticorpos CD14⁻, CD45⁻, CD90⁺ e CD105⁺. Demonstraram capacidade de diferenciar-se em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica. Em culturas contendo a laponita, a diferenciação foi possivelmente potencializada. Quanto à citotoxicidade, o material apresentou baixos resultados e houve aumento da viabilidade celular em todos os tempos analisados. A genotoxicidade entre a interação da célula com a Laponita[®] não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre o índice de dano e os grupos experimentais, porém, quanto a frequência de dano, a Laponita[®] 6% difere quando comparada Laponita[®] 3% em maior tempo de exposição. Com base neste estudo, conclui-se que a Laponita[®] representa um biomaterial potencialmente útil para a terapia celular.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais; Laponita; *Scaffold*; Toxicidade; Osteogênese.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells are undifferentiated cells, which are a promising tool in the field of regenerative medicine, as they have the ability to multiply while maintaining their undifferentiated state, in addition to renewing various tissues through their cell differentiation. Laponite is a synthetic nanoclay, used in several industrial applications and has characteristics that allow its use in tissue engineering. Recently, studies have been published that prove the ability of laponite to induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in vitro, which makes it an appropriate material for bone tissue engineering. However, little is known about the immunological reactions triggered by cytotoxic and genotoxic potentials that this interaction can provide. Thus, this work was carried out with the objective of evaluating the toxicity, at cellular and genomic level, of the integration of laponite in cultures of adipoderivative stem cells of rats, under authorization of the Ethics Commission in the Use of Animals (CEUA) of the UFPI, n. 665/21. The physical-chemical characterization of Laponita® was performed by Fourier transform infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis, X-ray diffraction, and micrographs were performed in a scanning electron microscope. The material also underwent cytotoxic screening using the *Artemia salina* lethality assay. Adipose tissue was harvested and cells were cultured at 5% CO₂ at 37°C. For cell characterization, morphology and CFU tests were performed, in addition to immunophenotyping by flow cytometry, for antibodies CD14, CD45, CD90 and CD105. Still, the cellular plasticity test, through induction for osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation, in addition to the evaluation of the osteogenic differentiation potential of Laponita® present in the medium. Cells were cultured with Laponita® at concentrations of 3% and 6% at three different times for analysis of cytotoxicity by MTT. Genotoxicity analysis was conducted using the comet assay to assess DNA damage and repair in individual cells. In the characterization of the material, results similar to those found in the literature were obtained, when the crystalline and organized chemical structure is evidenced. In thermogravimetric analyses, the degradation temperature was in accordance with data observed in other studies. Regarding toxicity, laponite obtained results below the LC₅₀. Mesenchymal stem cells showed fibroblastoid morphology, and presented CD14-, CD45-, CD90+ and CD105+ antibodies. They demonstrated the ability to differentiate into osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineages. In cultures containing laponite, differentiation was possibly enhanced. As for cytotoxicity, the material showed low results and there was an increase in cell viability at all times analyzed. The genotoxicity between the interaction of the cell with Laponita® did not show statistically significant differences between the damage index and the experimental groups, however, regarding the frequency of damage, Laponita® 6% differs when compared to Laponita® 3% in greater time of exhibition. Based on this study, it is concluded that Laponita® represents a potentially useful biomaterial for cell therapy.

Keywords: Mesenchymal stem cells; Laponite; *scaffold*; Toxicity; Osteogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema dos nanodiscos da laponita.....	23
Figura 2: Fórmula química da laponita.....	23
Figura 3: Estrutura química de um disco unitário da laponita.....	24
Figura 4: Representação esquemática da laponita em solução aquosa.....	25
Figura 5: Representação esquemática dos tipos de transporte de moléculas da laponita.....	27
Figura 6: Laponita após hidratação e agitação.....	40
Figura 7: Caracterização por DRX da Laponita [®]	41
Figura 8: Análise gráfica da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.....	42
Figura 9: Análises Térmicas DSC-TGA.....	43
Figura 10: Micrografias da Laponita [®] por microscopia eletrônica de varredura.....	44
Figura 11: Ensaio de toxicidade por Artemia salina.....	45
Figura 12: Formação de colônias e morfologia das células-tronco mesenquimais.....	46
Figura 13: Imunofenotipagem das ADSC.....	47
Figura 14: Ensaio de plasticidade das células-tronco mesenquimais.....	48
Figura 15: Ensaio de Diferenciação Osteogênica induzida pela Laponita [®]	49
Figura 16: Análise de citotoxicidade da Laponita [®] sobre ADSC por MTT.....	50
Figura 17: Efeitos genotóxicos (índice de dano e frequência de dano).....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGC1	Agrecano-1
ADIPOQ	Adiponectina
ADSC	Adipose-Derived Stem Cells
ALP	Fosfatase Alcalina
ANOVA	Análise de Variância
ANXA6	Anexina A6
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosina Trifosfato
bFGF	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
BGLAP	Osteocalcina
BGN	Biglicano
BJPS	Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences
CEUA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CFD	Fator de Complemento D
CFU-f	Unidades Fibroblásticas Formadoras de Colônia
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COL2A1	Colágeno Tipo II Alfa-1
COMP	Proteína da matriz oligomérica de cartilagem
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DCN	Decorin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difração de raios-X
DSC	Differential Scanning Colorimetry
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
Et al	E outros
FABP4	Proteína 4 de ligação a ácidos graxos
FD	Frequência de Dano
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
HCC1	Células osteoblásticas humanas precoces imortalizados

HCL	Ácido Clorídrico
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano- Isotipo DR
ID	Índice de Dano
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina 1
ISSO	International Organization for Standardization
ISTC	International Society for cellular Terapy
LEP	Leptina
LIB	Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular
LIMAV	Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados
LPL	Lipoproteína lípase
MATN1	Matrilina 1
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMP13	Metaloproteinase de matriz 13
MSCs	Mesenchymal Stem cells
NEAA	Non-Essential Amino Acids solution
NMP	Normal melting point
NUPCelt	Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-tronco
NTF	Núcleo de Tecnologia Farmacêutica
Oc	Octaédrica
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF-α	Fator de crescimento derivados de plaqueta alfa
PDGF-β	Fator de crescimento derivados de plaqueta beta
PHEX	Endopeptidase neutra reguladora de fosfato
PLGA	Poli(ácido-lático-co-ácido-glicólico)
PLIN	Perilipina
PPARG	Receptor gama ativado por proliferação de peroxissoma
Pref-1	Fator pré-adipócito 1
Rpm	Rotação por minuto
RUNX2	Fator de transcrição relacionado ao runt 2
SCs	Stem cells
SSEA-4	Expression of stage- specific embyonic antigen-4
SPP1	Osteopontina
Te	Tetraédrico

TGA	Análise termogravimétrica
UFC	Unidade formadora de colônia
UFPI	Universidade Federal Do Piauí
USA	United States of America
VECs	Células endoteliais vasculares
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Ångström
A	Alfa
Al₂O₃	Alumina
Al₃⁺	Cátion de Alumínio
B	Beta
©	Copyright
°C	Grau Celsius
CaO	Óxido de Cálcio
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
CL₅₀	Concentração Letal 50%
Cm	Centímetros
Cm²	Centímetros quadrados
CO₂	Dióxido de Carbono
Fe₂O₃	Óxido de Ferro
G	Gramas
g/cm³	Gramas por centímetro cúbico
h	Hora
K₂O	Óxido de potássio
KCl	Cloreto de potássio
Kv	Quilovolt
L	Litro
Li	Lítio
Li₂O	Óxido de lítio
mA	Miliampere
Mg	Magnésio
Mg/mL	Miligramas por mililitro
Mg 63	Células de osteossarcoma humano
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MgO	Óxido de magnésio
MgSO₄	Sulfato de magnésio
Min⁻¹	Unidade de velocidade angular
mL	Mililitro
mm	Milímetro

MTT	(3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio)
Na⁺	Cátion de Sódio
Na₂O	Óxido de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
Θ	Teta
p/v	Peso por volume
P0	Passagem zero
P3	Terceira Passagem
pH	Potencial Hidrogeniônico
®	Marca registrada
rpm	Rotação por minuto
Si	Silício
Si(OH)₄	Ácido ortosilícico
SiO₂	Dióxido de sílica
™	Trade mark
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
U/mL	Unidades por mililitro
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
V	Volt
≤	Maior ou igual que
±	Mais ou menos
λ	Lambda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.1 Células-Tronco.....	16
1.1.1 Células-Tronco Mesenquimais.....	17
1.1.2 Células-Tronco Mesenquimais Adipoderivadas.....	18
1.2 Argilas	20
1.3 Nanoargila Laponita	22
1.3.1 Estrutura Cristalina da Laponita	22
1.3.2 Dispersão da Laponita.....	24
1.3.3 Transporte de moléculas e Drogas.....	26
1.4 Laponita e Células-Tronco Mesenquimais	28
2. CAPÍTULO I*	32
INTRODUÇÃO	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
Preparo da Laponita® em gel.....	35
Difração de Raios-X (DRX)	35
Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	35
Análise Termogravimétrica (TGA).....	36
Microscopia Eletrônica de Varredura.....	36
Ensaio de Toxicidade <i>Artemia salina</i>	36
Aspectos Éticos e Obtenção de ADSC	36
Isolamento e Expansão das ADSC	37
Morfologia e Unidade Formadora de Colônia	37
Caracterização Imunofenotípica.....	37
Ensaio de Plasticidade Celular.....	38
Ensaio de Diferenciação Osteogênica induzida pela Laponita®	38
Análise de citotoxicidade da Laponita® sobre ADSC	39
Teste de Genotoxicidade por Ensaio Cometa	39
Análise estatística.....	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
Laponita® em Gel	40
Difração de Raios-X.....	41
Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	42
Análises Térmicas (DSC e TGA).....	43
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	44
Toxicidade por <i>Artemia Salina</i>	44
Morfologia e Unidade Formadora de Colônia- UFC	45
Caracterização Imunofenotípica.....	46

Plasticidade Celular	47
Diferenciação Osteogênica induzida pela Laponita®	49
Citotoxicidade da Laponita® sobre ADSC.....	50
Teste de Genotoxicidade por Ensaio Cometa	51
CONCLUSÃO	52
AGRADECIMENTOS	52
REFERÊNCIAS.....	53
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
4. REFERÊNCIAS.....	58

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Células-Tronco

As células-tronco são células indiferenciadas, caracterizadas pela produção de células especializadas e autorrenováveis. Historicamente, as primeiras células-tronco foram descritas em 1960 por Ernest McCulloch e James Till. Mediante experimentos realizados sobre os efeitos da radiação na medula óssea de camundongos, observaram que essas células apresentavam capacidade de se diferenciar em uma variedade de tipos celulares e, portanto, foram chamadas de células-tronco multipotentes (MCCULLOCH; TILL, 1960; TILL; MCCULLOCH, 1961). Posteriormente, consolidaram sua teoria das células-tronco (BECKER; MCCULLOCH; TILL, 1963).

Nas décadas seguintes os estudos acerca da plasticidade das células-tronco aumentaram com a evidência de que o desenvolvimento das células-tronco se inicia com a linhagem de células totipotentes, que são o tipo mais versátil, com potencial de gerar qualquer e todas as células que compõem o organismo. No desenvolvimento embrionário, o zigoto é o resultado da “fusão” de duas células germinativas (oócito e espermatozoide) que ocorre durante o processo de fertilização. (ZAGO; COVAS, 2006; MOORE; PERSUAD, 2008). Um zigoto em divisão forma blastômeros ou blastocisto e são as primeiras células que surgem logo após a fecundação, constituindo-se por células que pertencem à massa celular interna e podem originar quaisquer células das três camadas germinativas (endoderme, ectoderme e mesoderme). Desta forma, podem originar todas as células das camadas embrionária e extraembrionária, por isso são classificadas como células totipotentes (RAFF, 2003; MITALIPOV; WOLF, 2009).

Depois que o blastômero se divide no estágio de 32 células, temos o estágio do desenvolvimento pré-embrionário, que é chamado de mórula (O’FARRELL; STUMPF; SU, 2004). As células que formam a mórula perdem totipotência e tornam-se pluripotentes, o que significa que são capazes de promover o desenvolvimento do embrião, mas perdem a capacidade de formar o trofoblasto (que dá origem à placenta). Assim, o termo "células-tronco pluripotentes" refere-se as células que contribuem para todas as três camadas germinativas, ou seja, mesoderme, ectoderma e endoderme, mas não trofoblastos (BOIANI; SCHÖLER et al., 2005).

Conforme o estágio de desenvolvimento embrionário vai evoluindo, a potencialidade de diferenciação de suas células vai decaindo (LIN et al., 2008) ou seja, a medida que ocorre a especialização celular (as células-tronco se diferenciam e se comprometem em uma

determinada linhagem), elas perdem a capacidade de originar células de outras camadas germinativas e passam a ser classificadas como multipotentes, também conhecidas como células-tronco adultas (WEISSMAN, 2004; WAGERS, 2004; HSU; FUCHS, 2012).

Thomson et al. (1998) foram os primeiros a isolar as células-tronco, desenvolvendo pela primeira vez em laboratório uma linhagem de células-tronco extraídas de embriões humanos. Foi gerada muita expectativa na comunidade científica em torno do potencial terapêutico dessas células, no entanto, a utilização de células-tronco embrionárias para pesquisa e, possível, aplicação clínica levanta considerações éticas em diversos países (GROUNDS et al., 2002; HONOLD et al., 2004; BROCK, 2006; NISHIKAWA; JAKT; ERA, 2007).

1.1.1 Células-Tronco Mesenquimais

Friedenstein et al., 1966 descreveram, pela primeira vez, a existência de outros tipos de células progenitoras, localizada na medula óssea. Em um ensaio *in vivo*, demonstraram que células da medula óssea, ao serem implantadas em ratos, começaram a formar osteoblastos com nódulos mineralizados semelhantes a osso, condroblastos, adipócitos e até mioblastos. Já na década de 1970 Friedenstein e seus colaboradores, realizaram outros experimentos *in vitro*, demonstrando que, quando células da medula óssea eram cultivadas em baixa densidade, poucas delas aderiam, proliferavam e geravam colônias (BIANCO; ROBEY; SIMMON, 2008).

Devido a descoberta da grande aderência das células-tronco mesenquimais às placas de cultura, foi possível eliminar as células não-aderentes, principalmente as células-tronco hematopoiéticas e sua progênie. As células cultivadas que expressaram aderência apresentavam morfologia fusiforme, similares a fibroblastos, e eram capazes de formar colônias derivadas de uma única célula. Friedenstein definiu essa característica como "unidades fibroblásticas formadoras de colônia" (CFU-f) (FRIEDENSTEIN; PIATETZKY-SHAPIRO; PETRAKOVA, 1966; FRIEDENSTEIN et al., 1974; PHINNEY, 2002).

Essas células indiferenciadas, estão localizadas em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos e foram denominadas de células-tronco mesenquimais (MSC). No organismo, são responsáveis pela manutenção da população de células funcionais e pela reparação de lesões teciduais. Estas células são autorrenováveis e com capacidade de originar tipos celulares diferenciados morfofisiologicamente. Estas características permitem que as MSC realizem a reparação e manutenção de todos os tecidos do organismo (PITTENGER et al., 1999; ERICES; CONGET; MINGUELL, 2000).

Inicialmente, acreditava-se que as MSC eram células tecido-específicas (possuem seu

potencial de diferenciação comprometido somente às células do tecido no qual se encontram). Porém, nos últimos anos, diversas pesquisas têm demonstrado que algumas linhagens de MSC são capazes de originar tecidos diferentes de sua formação embrionária (SMITH, 2001; ODORICO; KAUFMAN; THOMSON, 2001; FISHER et al., 2002; GRITTI; VESCOVI; GALLI, 2002).

As MSC exibem grande plasticidade e possuem potencial para aplicações terapêuticas, porém, eram mal definidas. Isso levou a uma heterogeneidade de nomes e fenótipos atribuídos por diferentes grupos a essa população de células. As MSC estão presentes na medula óssea e em muitos outros tecidos, e são identificadas por meio de uma combinação de propriedades físicas, fenotípicas e funcionais. Uma série de revisões descreveram adequadamente a natureza das MSC (SHORT et al., 2003; ZIPORI, 2004; BARRY; MURPHY, 2004; BAKSHI et al., 2004; JAVAZON; BEGGS; FLAKE, 2004).

De acordo com o comitê da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISTC), sua caracterização é baseada em três critérios:

- I. Capacidade de adesão à superfície plástica;
- II. Marcação para um conjunto de antígenos de superfície (positiva para marcadores como CD90, CD44, CD73, CD105; negativa para marcadores como CD14, CD34, CD45 e CD11b);
- III. Diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteoblastos, após a adição de agentes indutores em cultura.

Dessa forma, a fim de esclarecer a identidade *in vivo* das MSC, estudos vêm sugerindo que essas células possuem uma correlação com os pericitos, e, por isso, poderiam ser encontradas na região perivascular de pequenos e grandes vasos. Essa hipótese explicaria a possibilidade de isolamento das MSC em quase todos os tecidos do organismo (CHAGASTELLES; NARDI, 2006; CRISAN et al., 2008; CAPLAN, 2009; MEIRELLES; NOMBELA-ARRIETA; RITZ; SILBERTEIN, 2011). Como ainda não há um consenso entre a comunidade acadêmica sobre a nomenclatura dessas células, será utilizado o termo células-tronco mesenquimais no presente estudo.

1.1.2 Células-Tronco Mesenquimais Adipoderivadas

O tecido adiposo é o tecido mais abundante em humanos, representando 10-29% do peso corporal de um adulto com peso normal (KAHN, 2008). É um órgão endócrino que

armazena energia e libera vários hormônios do tecido adiposo, como leptina e adiponectina que regulam a homeostase metabólica (UNGER; SCHERER; HOLLAND, 2013). As células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) foram identificadas pela primeira vez em 2001 e desde então, este, tem sido estudado como fonte de células para engenharia de tecidos e medicina regenerativa (ZUK et al., 2002). Existem vários termos para células-tronco derivadas deste tecido, como pré-adipócitos, células estromais derivadas de gordura, células lipoaspiradas, células-tronco mesenquimais derivadas de gordura e células-tronco de gordura. Em 2004, chegou-se a um consenso sobre a nomenclatura ADSC (UNGER; SCHERER; HOLLAND, 2013).

As ADSC representam uma das principais populações de células que contribuem para a regeneração de células adiposas em qualquer tipo de processos de reparo após lesão (OGURA et al., 2014) ou expansão devido a danos teciduais relacionada a forças mecânicas externas (KATO et al., 2010). Esses processos regenerativos envolvem o equilíbrio entre apoptose e necrose de adipócitos e gametogênese induzida por ADSC. Eto et al. (2009) demonstraram que 1cm de tecido adiposo intacto contém milhões de células, incluindo: principalmente os adipócitos, células-tronco derivadas do tecido adiposo, células endoteliais vasculares (VECs), pericitos, fibroblastos, tecido conjuntivo, macrófagos e linfócitos localizados no tecido adiposo (PU; HAN; YANG, 2015).

O tecido adiposo é rico em capilares, e cada adipócito está associado a uma rede de capilares. O tamanho de um adipócito varia de 50 a 150 μ m, e sua vida útil é de aproximadamente 10 anos (SPALDING et al., 2008). Assim como o pericito, as ADSC circundam os capilares entre os adipócitos e liberam fatores angiogênicos (SUGA et al., 2009). Além disso, são capazes de se diferenciarem em adipócitos e VECs (PLANAT-BENARD et al., 2004).

As ADSC têm marcadores de superfície celular, como CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105, e não possuem marcadores hematopoiéticos e endoteliais CD14, CD31, CD34, CD45 e HLA-DR, indicando sua natureza de MSC (BOURIN et al., 2013; SHAH et al., 2014). No entanto, as ADSC isoladas de tecidos omentais e adiposos subcutâneos humanos exibem as mesmas propriedades eletrofisiológicas, morfológicas e de expressão de citocinas e potenciais multilinhagens. Seus antígenos de superfície se assemelham aos das células-tronco derivadas da medula óssea, mas não incluem marcadores adipogênicos como fator pré-adipócito 1 (Pref-1) e adiponectina (BAGLIONI et al., 2009).

As ADSC são mediadoras da regeneração tecidual através da secreção de inúmeros fatores solúveis específicos. Além disso, as ADSC secretam vários fatores de crescimento. Estes incluem: fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e o fator de crescimento transformador beta 1 (TGF)- β 1 (SALGADO, 2010). Tecidos e órgãos recém transplantados sofrem hipoxia devido à ausência de vasos sanguíneos originais e possuem maior tendência à morte celular através de apoptose. Estudos realizados em camundongos mostraram que as expressões destas citocinas tornam as ADSC uma fonte promissora para pacientes transplantados com isquemia (REHMAN et al., 2004; BHANG et al., 2009; LEE et al., 2009). Ademais, secretam fator de crescimento derivado de plaquetas alfa (PDGF- α) e beta (PDGF- β) (MUTHUKRISHNAN; WARDER; MCNEIL, 1991; WERNER; GROSE, 2003; KAEWSUWAN et al., 2012), fator de crescimento epidérmico (EGF) e várias outras sinalizações que medeiam a regeneração tecidual (KILROY et al., 2007; SONG; CHUNG; SUNG, 2010)

1.2 Argilas

Uso de argila para diversos fins é uma prática tão antiga entre os humanos quanto a própria história da humanidade. Há evidências arqueológicas de que em tempos pré-históricos *Homo erectus* e *H. neanderthalensis* aplicavam "solo medicinal" (argila) para limpeza e cicatrização de feridas. No Egito, Cleópatra aplicava lima do Mar Morto em sua pele para fins estéticos. Além disso, era usado para mumificação e como anti-inflamatório a Terra Núbia. Na Europa, durante a Idade Média, era utilizado uma argila vermelha, o fuste armênio, como "pedra medicinal" ou "pedra vital", em um contexto místico e religioso. Há também relatos de algumas tribos africanas e índios sul-americanos que praticavam geofagia para tratar problemas gastrointestinais (MORAES et al., 2017; MASSARO et al., 2018; MOUSA et al., 2018; VISERAS et al., 2019).

As diversas aplicações das argilas em diferentes culturas ao longo dos anos resultaram em diferentes significados atribuídos a esses materiais. No entanto, de acordo com a *Clay Minerals Society*, o termo "argila" denota um grupo de materiais de origem natural compostos por partículas cristalinas de grãos finos que adquirem elasticidade na presença de água e endurecem por secagem ou aquecimento. Ainda, ela pode ser considerada como uma rocha que, devido ao seu processo de formação constituem partículas finamente divididas (GRIM, 1968;

SANTOS, 1976). Do ponto de vista químico, esses materiais são formados por minérios com estruturas cristalinas específicas conhecidas como minerais argilosos. Além dos demais compostos como matéria orgânica, calcita, dolomita, quartzo, gibisita, pirita e hematita (GUGGENHEIM et al., 1995; SILVA et al., 2018; BURITI et al., 2019).

Os argilominerais são os minérios constituintes da argila que lhes conferem propriedades básicas. Esses minerais pertencem a família dos filossilicatos cuja estrutura é composta por duas unidades estruturais: uma unidade é formada por oxigênio ou hidroxila na organização octaédrica (Oc) com um átomo de alumínio, magnésio ou ferro no centro do octaedro, na outra unidade é formada por uma placa tetraédrica (Te) de silicato. Na unidade Te o átomo de silício está no centro do tetraedro e apresenta a mesma distância dos quatro átomos de oxigênio (LÓPEZ-GALINDO; VISERAS; CERREZ, 2007; CHRISTIDIS, 2011; ZHU et al., 2016; MORAES et al., 2017). Os argilominerais são compostos basicamente de partículas com pelo menos uma dimensão menor que 2 μ m, embora alguns minerais argilosos estejam na faixa de nanômetros de 1 a 100nm. Na composição química dos argilominerais, além dos óxidos de ferro (Fe₂O₃), magnésio (MgO), cálcio (CaO), sódio (Na₂O), potássio (K₂O), existem também elementos essenciais como a sílica (SiO₂), alumina (Al₂O₃) e outros. Os minerais de argila também são chamados de camadas de silicato e filossilicato (GOMES, 1988; NEUMANN et al., 2000; GHADIRI; CHRZANOWSKI; ROHANIZADEH, 2015; KAUSAR et al., 2018).

Atualmente, são conhecidos cerca de 30 tipos de argilominerais, que possuem nomenclatura e propriedades físico-químicas específicas (KHATOON; CHU; ZHOU, 2020). No entanto, apenas alguns destes materiais são estudados pelo seu valor tecnológico, constituem “argilas industriais” ou “argilas especiais” (SILVA et al., 2017). Este grupo inclui os minerais argilosos caulinita, serpentina, vermiculina, mica, setiolita, poligosquita, clorita e esmectita. Destas, as esmectitas têm sido estudadas extensivamente e possuem importantes utilizações técnicas e científicas (COELHO; SANTOS; SANTOS, 2007; YANG et al., 2016; MACHADO et al., 2018).

A esmectita constitui um complexo conjunto de argilominerais com uma estrutura de lamelas contendo camadas do tipo 2:1 (tetraédrica-octaédrica-tetraédrica) (MORAES et al., 2017). Especialmente na indústria farmacêutica e cosmética, as esmectitas desempenham um papel importante. Estão presentes em formulações orais e tópicas, seja como ingredientes ativos, como antiácidos, protetores gastrointestinais e agentes antidiarreicos; às vezes como excipientes, com ação desintegrante, diluidora, aglutinante, emulsificante, espessante,

antiaglomerante e corretor de sabor. No entanto, esses argilominerais têm sido largamente estudados para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos (CARRETERO; POZO, 2009; CARRETERO; POZO, 2010).

1.3 Nanoargila Laponita

Entre 1965 e 1970, as indústrias Laporte desenvolveram e introduziram no mercado internacional uma hectorita sintética derivada do talco, a “laponite B” (COELHO; SANTOS; SANTOS, 2007), que possui estruturas e tecnologia idênticas a hectorita natural, além disso, tem como característica ser livre de impurezas. A laponita é uma nanoargila inorgânica sintética com alta pureza química e dispõe de uma aparência de pó branco e fino (CUMMINS, 2007). Ela é produzida pela combinação de magnésios de sódio e lítio com silicato de sódio a uma taxa de temperatura bem controlada. Com esta combinação formará um sedimento amorfo que irá cristalizar parcialmente quando tratado com alta temperatura. Para a obtenção do produto final é então filtrado, lavado, seco e moído a um pó branco fino (ADDITIVES, 2008).

A laponita é uma hectorita sintética que pertence ao grupo das argilas esmectitas. Por ser uma esmectita, apresenta estrutura cristalina do tipo 2:1 (Te-Oc-Te). Também possui alta capacidade de troca catiônica e capacidade de inchamento em água (SILVA; FERREIRA, 2008, CIDONIO et al., 2019). Amplamente utilizado em aplicações industriais para modificar as propriedades reológicas de fluidos como tintas, produtos de higiene pessoal e cosméticos, revestimentos de superfície, produtos agrícolas e outros. A laponita também é usada como formadora de filme como revestimentos elétricos e antiestáticos para criar nanocompósitos otimizados (RUZICKA; ZACCARELLI, 2011).

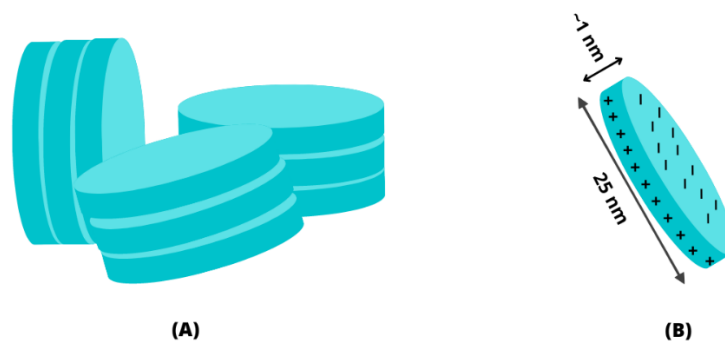
Quando disperso em água ou qualquer solvente orgânico polar pode causar dispersão coloidal ou solviscoelástica. (dispersão em fase líquida) e gel altamente flexível. A dispersão (dispersão na fase sólida) depende do tipo de argila, da concentração, da adição e da concentração de outras substâncias, composição e modo de preparo (LABANDA; SABATÉ; LLORENS, 2007).

1.3.1 Estrutura Cristalina da Laponita

A laponita consiste em aglomerados de cristais agregados de tamanho nanométrico (partículas). Essa agregação ocorre devido à atração eletrostática entre os íons de sódio (Na^+), compartilhados entre os cristais, e os elétrons neles presentes. Os cristais de laponita são discos

redondos (Figura 1A) e possuem cerca de 25nm de diâmetro e cerca de 1nm de espessura (TOMÁS; ALVES; RODRIGUES, 2017) (Figura 1B). Estes nanodiscos apresentam uma densidade de 2,53 g/cm³. Cada nanoplaca incluiu aproximadamente 2000 células unitárias, com estrutura química de maioria SiO₂ com 66,2%; MgO com 30,2%; Na₂O com 2,9 %; e Li₂O 0,7%. A fórmula química mínima da laponita corresponde à representada na Figura 2 (TAWARI; KOCH; COHEN, 2001):

Figura 1: Esquema dos nanodiscos da laponita.



Fonte: Adaptado de Braga (2019). (A) corresponde aos nanodiscos de laponita agregados em pilhas. (B) corresponde a um disco unitário da laponita com exemplificação de suas dimensões.

Figura 2: Fórmula química da laponita.



Fonte: Adaptado de Chaparro (2016). Fórmula mínima da laponita, podendo variar com o grau de substituição isomorfa entre 0,5 e 1,3.

Conforme já indicado, as esmectitas possuem estrutura 2:1, e a laponita, da classe das esmectitas, possui estrutura onde cada plaqueta de nanoargila, apresenta uma camada octaédrica com átomos de magnésio (Mg) entre duas camadas tetraédricas de silício (Si) (Figura 3) (SHI et al., 2018; PAGE et al., 2019; GOMBOS et al., 2020; PERARO et al., 2020).

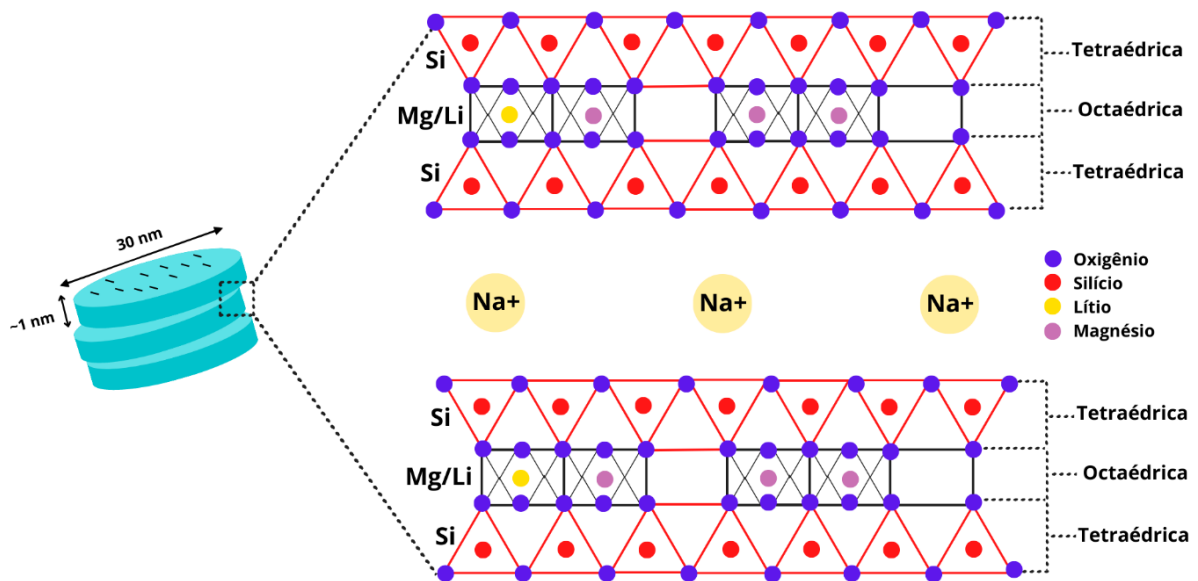
A disposição das plaquetas da laponita apresentam cátions de magnésio nos sítios octaédricos, que são substituídos isomorficamente por lítio (Li), o que resulta em uma

deficiência de íons positivos, contraposta pela presença de cátions de sódio (Na^+) presentes nos espaços interplanares (SHI et al., 2018; LAPASIN, 2020; PERARO et al., 2020; MICHELS et al., 2020).

A possibilidade de troca iônica das argilas com o meio, é denominada troca catiônica e é uma propriedade de muito interesse. Em camadas tetraédricas, os íons Si_4^+ podem ser substituídos por íons trivalentes como o Al_3^+ . Os raios atômicos semelhantes não distorcem a estrutura da argila. No entanto, a diferença de carga cria uma carga negativa, que deve ser compensada pelos cátions na região interlamelar. Este fenômeno é conhecido como substituição isomórfica (SHAW, 1975; BUK, 2018).

As substituições isomórficas ocorrem de maneira que uma carga negativa líquida é equilibrada por carga positiva de sódio. Os íons de sódio neutralizam a carga negativa quando esses, são adicionados durante a produção da laponita. Com isso ficam adsorvidas entre as lamelas da nanoargila (RUZICKA; ZACCARELLI, 2011).

Figura 3: Estrutura química de um disco unitário da laponita.



Fonte: Elaborado pela autora (2023). Estrutura da célula unitária da laponita com uma estrutura em camadas do tipo 2:1, constituída por duas camadas tetraédricas de silício e uma camada central octaédrica de magnésio ligadas por átomos de oxigênio.

1.3.2 Dispersão da Laponita

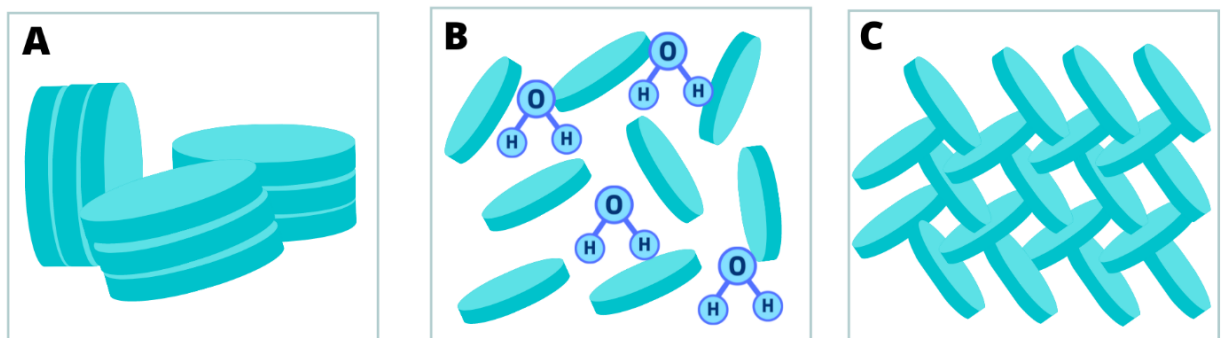
A laponita possui uma elevada capacidade de troca de cátions e de inchamento em água (BRAGA, 2019; CIDONIO et al., 2019) a propensão para inchaço das partículas carregadas, dá

origem a uma rica seleção de potenciais interações entre as moléculas orgânicas e as superfícies das partículas de argila, poros entre camadas e espaços entre partículas envolvendo uma série de mecanismos, incluindo troca catiônica, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, pontes de cátions, troca aniônica e transferência de prótons (ŠEBENIKA et al., 2020).

Para preparar uma dispersão coloidal de laponita em meio aquoso é necessário o controle do pH do meio a fim de garantir a estabilidade termodinâmica da estrutura cristalina das nanoplaquetas (BECHER et al., 2019). Quando a nanoargila é dispersa em água, a estrutura de nanodiscos (Figura 4A) incha devido as moléculas de água penetrarem entre eles (Figura 4B), por efeito da atração pelos íons de Na^+ intercalados. E as moléculas uma vez inseridas, dissolvem os íons de Na^+ resultando na dispersão coloidal dos nanodiscos carregados. Após a liberação dos íons Na^+ dos nanodiscos, uma carga negativa homogênea é criada na superfície de aproximadamente -700, e durante o processo de protonação dos grupos hidroxila na parte final da estrutura cristalina, uma carga positiva na borda de aproximadamente +50 para $\text{pH} \leq 11$ (KUMAR; MURALIDHAR; JOSHI, 2008; ADDITIVES, 2008; CHIU et al., 2014).

Em meios com alta concentração iônica e em pH abaixo do ponto isoelétrico da borda, as cargas positivas são atraídas para as camadas carregadas negativamente das faces (NICOLAI; COCARD, 2001) Quando este é o fenômeno de interação dominante, são formadas ligações eletrostática entre as bordas carregadas positivamente e as faces carregadas negativamente as partículas se agregam em uma rede tridimensional, chamada de estrutura “Castelo de Cartas” (Figura 4C). Esta estrutura é típica do estado de gel de alta densidade da laponita (RAND et al., 1980; DIJKSTRA; HANSEN; MADDEN, 1995).

Figura 4: Representação esquemática da laponita em solução aquosa.



Fonte: Elaborado pela autora (2023). (A) laponita em nanodiscos empilhados; (B) dispersão (esfoliação) das plaquetas de argila em água, e (C) estrutura de castelo de cartas.

A quantidade de cargas negativas corresponde à liberação de todos os íons de sódio da superfície dos nanodiscos. Já a quantidade de cargas positivas presentes nas bordas dos nanodiscos depende do pH. Esta diminui lentamente com o aumento do pH. Cummins demonstrou, portanto, por meio de testes sistemáticos, que o pH das soluções de laponita sempre será 10, mesmo que a nanoargila seja suspensa em água com pH 10 ou em água deionizada sem um valor de pH fixo. Consequentemente, e em condições experimentais normais, as bordas dos nanodiscos da laponita apresentarão cargas positivas (CUMMINS, 2007).

Bippus, Jaber, Lebeau (2009) estudaram a dispersão da laponita em água destilada, usando agitação mecânica, durante 24 horas à temperatura ambiente. Observaram tamanhos de partículas variando de 3 a 10nm, 10 a 100nm, 90 a 400nm. tamanhos de partícula superiores a 10nm foram associados à presença de agregados de plaquetas. Estes resultados são consistentes com aqueles relatados por Pignon et al. (1997), e com Daniel; Frost; Zhu (2007) que estudaram a dispersão da laponita em água.

1.3.3 Transporte de moléculas e Drogas

Particularmente no campo farmacêutico, as propriedades da laponita provaram ser muito úteis. A possibilidade de intercalação de moléculas orgânicas, como drogas, entre as lamelas do nanodisco pode facilitar interações que podem levar à sua liberação de forma controlada (BECHER et al., 2019). Esse tipo de estratégia tem sido amplamente explorado pela indústria com o objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas dos medicamentos e da farmacoterapia (PARK et al., 2008; VASVÁRI et al., 2018).

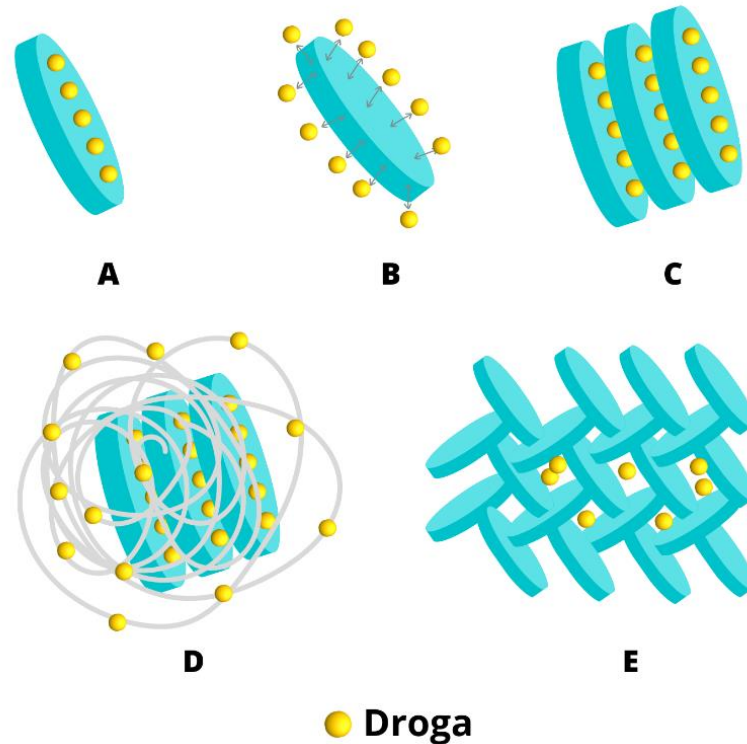
Quanto ao transporte de moléculas orgânicas na estrutura da laponita, pode ser feito de diversas formas (Figura 5) (5A) por adsorção nas superfícies da laponita quando a argila está no estado esfoliado; (5B) por ligação covalente às bordas da argila; (5C) por intercalação nas pilhas de cristais de argila (5D) por interação ou encapsulamento com polímero; (5E) e por encapsulamento dentro dos espaços interlamelares na rede "Castelo de Cartas" (DAWSON; OREFFO, 2013; CHIU et al., 2014; TOMÁS; ALVES; RODRIGUES, 2018).

As nanoestruturas carregadas de laponita exibem uma interessante habilidade de absorção e liberação sustentada de drogas ou fatores de crescimento. Estudos relatam retenção bem-sucedida e liberação controlada de alta potência da proteína de fator de crescimento endotelial vascular por meio da laponita (AGUZZI et al., 2007; VISERAS et al., 2010;

DAWSON et al., 2011 ZHANG et al., 2020).

Assim como, outras esmectitas, a laponita exhibe rica composição química superficial e de intercalação, e pode interagir com outros componentes químicos, bem como compostos polares e apolares. Como cristais discretos dispersos em solução, a laponita também pode adsorver muitos tipos de íons ou moléculas em sua superfície.

Figura 5: Representação esquemática dos tipos de transporte de moléculas da laponita.



Fonte: Adaptado de Tomás; Alves; Rodrigues (2018). As drogas podem ser transportados por (A) Por adsorção; (B) Por ligação covalente; (C) Por intercalação; (D) Por interação ou encapsulamento; (E) Por encapsulamento dentro dos espaços “castelo de cartas”.

Os mecanismos de interações da laponita com outras moléculas pode envolver troca iônica clássica, forças de Van de Waals, ligação de hidrogênio e ponte catiônica e também protonação e troca de ligante nas bordas do disco (CHIU et al., 2014). Uma vez que, a laponita se agrega quando está dispersa em uma solução, as interações eletrostáticas das cargas positivas fracas ficam distribuídas ao longo de suas bordas sendo capaz até de interagir diretamente com as cargas negativas em superfície de outros discos de argila por meio do “castelo de cartas” (PAVLIDOU; PAPASPYRIDES, 2008; COELHO, 2008; BRAGA, 2019).

Como um veículo para liberação de drogas na nanomedicina, a laponita foi estudada em combinação com diversos materiais (principalmente polímeros). Na verdade, uma série de sistemas de liberação de drogas foi proposto para que esta nanoargila tenha sido usada tanto

como argila esfoliada quanto em escala micro/macro (*scaffold*). Em cada caso, o mecanismo de liberação da droga mostrou-se dependente do sistema de liberação de drogas combinado com as interações estabelecidas entre a droga e os componentes do material (AGUZZI et al., 2007; DAWSON; OREFFO, 2013; CHIU et al., 2014; TOMÁS; ALVES; RODRIGUES, 2017).

1.4 Laponita e Células-Tronco Mesenquimais

A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa beneficiam-se do potencial de células-tronco para substituir tecido danificado por ferimentos ou doenças. Biomateriais como os hidrogéis servem, neste contexto, para fornecer um suporte, ou *scaffold*, capaz de promover o crescimento de novos tecidos através do fornecimento de estruturas que direcionam a função das células-tronco (LUO; SHOICHET, 2004; KIM et al., 2020).

As propriedades exclusivas da laponita, como alta biocompatibilidade, morfologia anisotrópica e grande área de superfície, permitem que muitas aplicações sejam aprimoradas com vantagens biológicas e tecnológicas (LI et al., 2018). A maioria das argilas são encontradas na natureza, mas também podem ser construídas sinteticamente. As propriedades das argilas dependem de sua estrutura cristalina e da composição química de seus constituintes. Em aplicações biomédicas, minerais argilosos inorgânicos são adicionados a polímeros biocompatíveis para aperfeiçoar as propriedades mecânicas e reológicas, e promover a degradação da base polimérica (CUMMINS, 2007).

As nanopartículas de argila também podem favorecer a resistência mecânica, tenacidade e propriedades de degradação do suporte sólido. Isso possibilita a criação de matrizes porosas com propriedades mecânicas aprimoradas (VALENCIA et al., 2015). Propriedades mecânicas, além da resistência à tração, resistência à compressão, módulo, alongamento e degradação, podem ser atribuídas às estruturas únicas de cada um dos hidrogéis poliméricos e nanocompósitos poliméricos, dependendo de sua combinação, concentração e aparência. Esses nanocompósitos podem ser feitos em várias formas e tamanhos, e suas propriedades podem ser controladas ou adequadas de acordo com suas respectivas necessidades, alterando a composição e suas condições (HARAGUCHI, 2011).

Considerando as propriedades referidas, o uso da laponita associada a células-tronco vem ganhando, cada vez mais, espaço nas pesquisas, principalmente às células-tronco mesenquimais (BYDLOWSKI et al., 2009; WANG et al., 2014; FIORE et al., 2015; SUN et al., 2017). As evidências fornecidas a respeito do isolamento, cultivo e da plasticidade dessas

células, além do conhecido potencial regenerativo, motivou a utilização de células-tronco mesenquimais na clínica aplicada para diferentes tipos de doenças (BURT; TRAYNOR, 1999; LJUNGMAN et al., 2010). Áreas de aplicação na engenharia de tecidos, como a de enxertos autólogos ou não autólogos, tem sido uma prática bastante utilizada para reconstrução de lesões cutâneas (KIRBY, 2015), estimulando outras populações no processo de recuperação do tecido danificado e promovendo a quimiotaxia de células envolvidas no processo de reparo (FUCHS, TUMBAR, GUASCH, 2004; MORRISON et al., 2008).

Quando relacionado à diferenciação em osteogênica para posterior formação de um tecido, são necessários três elementos fundamentais: osteoprogenitores, fatores de crescimento e *scaffolds* (CRANE et al., 1995; SZPALSKI et al., 2012). Para esta finalidade, um *scaffold* ideal deve ser osteoindutor e osteocondutor. A maioria dos materiais disponíveis atuam apenas como osteocondutores e auxiliam como suporte para o crescimento de progenitores, mas carecem de osteoindutividade (LU et al., 2016). Portanto, há uma necessidade de desenvolver novos materiais que possam moldar-se como osteoindutores e osteocondutores para engenharia de tecido ósseo (ZOU et al., 2017; ZHANG et al., 2018).

A nanopartícula laponita aumenta significativamente a expressão gênica da fosfatase alcalina (ALP) e osteocalcina após exposição da molécula de Si(OH)_4 presente em sua composição estrutural, revelando um aumento na diferenciação osteogênica. Um estudo realizado por Reffitt et al. (2003) utilizando células de osteossarcoma humano (MG 63), que são células semelhantes a osteoblastos derivadas de células estromais da medula óssea e células osteoblásticas humanas precoces imortalizadas (HCC1), indica que é necessário concentrações de 10 e 20 μm de ácido ortossilícico (Si(OH)_4) para aumentar a síntese de colágeno tipo I, sendo este, bastante importante para a osteogênese.

Os íons de magnésio (Mg) liberados pela laponita também podem causar reações intracelulares, ele está situado na camada octaédrica e é um elemento extremamente importante no corpo humano. Não só está envolvido na estabilização de todos os compostos de polifosfato nas células como adenosina trifosfato (ATP), que é a principal fonte de energia nas células, mas também é necessário para muitas funções celulares, incluindo atividade enzimática, ação do canal vias metabólicas e processos de sinalização (SWAMINATHAN, 2003; ROMANI, 2011).

Outros íons presentes na composição estrutural da laponita são os íons de sódio (Na) e lítio (Li). O papel dos íons de sódio e lítio no corpo também são muito importantes. Entre outras funções metabólicas, sabe-se que o sódio interfere na geração de impulsos nervosos e

desempenha um papel na manutenção do equilíbrio de fluidos e eletrólitos (POHL; WHEELER; MURRAY, 2013). Por outro lado, o lítio é conhecido por influenciar o comportamento neuronal, enzimas e vias de transdução de sinal (WILLIAMS et al., 2004; MICHELS et al., 2020).

Em pesquisas realizadas por Mikhaila et al. (2013) e por Gaharwar et al. (2013) utilizando a laponita em culturas de MSC, verificaram a natureza intrínseca da argila para estimular a diferenciação osteogênica na ausência de fatores de indução. Uma sequência de eventos foi desencadeada conforme o padrão temporal clássico de marcadores de diferenciação: aumento da atividade da ALP, regulação positiva do fator de transcrição relacionado a Runt-2 (RUNX2), deposição de proteína da matriz relacionada ao osso (osteocalcina e osteopontina) e mineralização da matriz.

Mihaila et al. (2014) realizaram outros experimentos, para avaliar o papel da laponita na diferenciação osteogênica. Nestes, a fração vascular estromal do tecido adiposo foi usada para isolar uma subpopulação de células-tronco derivadas do tecido adiposo humano, expressando o marcador associado à pluripotência SSEA-4 com potencial de diferenciação superior em relação à linhagem osteogênica. Nessas condições, também foi induzida a superexpressão de marcadores osteogênicos relacionados (RUNX2, osteopontina, osteocalcina) bem como, aumento da atividade de ALP, deposição de colágeno tipo I e mineralização da matriz.

Outras pesquisas também demonstraram que, a ligação de laponita a *scaffolds* usados para o crescimento celular pode promover a diferenciação celular para a linhagem osteogênicas. Wang et al. (2012) combinaram nanodiscos de laponita com nanofibras de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) eletrofiadas e os usaram como *scaffolds* para promover o crescimento das MSC em meios de cultura sem fatores estimuladores da osteogênese. Os resultados foram semelhantes aos encontrados por Mihaila e Gahaewar e, além disso, a utilização da laponita com nanofibras de PLGA aprimorou a estabilidade estrutural e as propriedades mecânicas dos hidrogéis, além do aumento da adesão celular

A possibilidade de utilização de argilas artificiais como a laponita, produzida em grandes quantidades, a baixo custo e com pureza, composição e dimensões cristalinas controladas, traz um renovado interesse em utilizações biomédicas (ADDITIVES, 2014; TOMÁS; ALVES; RODRIGUES, 2017). Tem a vantagem adicional de ser composto por cristais em nanoescala, que também possuem diversas aplicações tecnológicas, além de serem

aplicadas como formadores de filmes (JUNGST et al., 2016). A laponita pode ser caracterizada na engenharia de tecidos, e, se usada sozinha, pode levar a reações biológicas específicas. Além disso, pode atuar como carreador de fármacos e fatores bioquímicos, como *scaffolds*; nanopartículas dispersas ou imobilizadas (WANG et al., 2013; ADDITIVES, 2014; GONÇALVES et al., 2014; TOMÁS; ALVES; RODRIGUES, 2017) e regeneração (LI et al., 2018).

Considerando a biocompatibilidade e demais propriedades da laponita, este biomaterial apresenta grande potencial em diversas áreas biomédicas (PARK et al., 2020). Porém, devido a sua variabilidade de aplicações, os minerais de argila têm sido sujeitos a regras e regulamentações em todo o mundo, e devem cumprir requisitos técnicos específicos que levam em consideração questões químicas, físicas e toxicológicas (LÓPEZ-GALINDO et al., 2007; CHAPARRO, 2016).

Assim, as células-tronco presentes no organismo adulto são uma opção em potencial para a continuidade de estudos experimentais e ensaios clínicos envolvendo o uso de biomateriais para a medicina regenerativa. Dessa forma, é necessário avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* da laponita em culturas de células-tronco mesenquimais adipoderivadas, para proporcionar segurança terapêutica e estabelecer, assim, uma concentração do material associadas às células que seja capaz de manter a homeostasia.

2. CAPÍTULO I*

*(Submetido ao periódico “*Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences (BJPS)*”).

Potencial citotóxico e genotóxico da Laponita[®] em culturas de células-tronco mesenquimais adipoderivadas de murino.

Francisca Louenny Alves Cardoso^{1*}, Letícia Lorryne da Silva Soares¹, Danielle Benigno de Andrade e Silva², Napoleão Martins Argolo Neto¹, Edson Cavalcanti da Silva Filho², Adalberto Socorro da Silva³, João Marcelo de Castro e Sousa⁴, Antonielly Campinho dos Reis⁴, Mérik Rocha-Silva¹, Maria Acelina Martins de Carvalho¹

¹Núcleo Integrado e Morfologia e Pesquisas com Células-tronco NUPCelt, UFPI, Teresina, PI, Brasil. ²Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados, LIMAv, UFPI, Teresina, PI, Brazil., ³Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular, LIB, UFPI, Teresina, PI, Brazil. ⁴Laboratory of Toxicological Genetics (LAPGENIC), UFPI, Teresina, PI, Brazil.

Este trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade em nível celular e genômico da Laponita[®] em culturas de células-tronco adipoderivadas de ratos. A caracterização química da Laponita[®] foi realizada por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, análise termogravimétrica, difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura. O material passou por uma triagem citotóxica, por meio do ensaio de letalidade de *Artemia salina* e os resultados foram inferiores à CL₅₀. As células-tronco mesenquimais foram coletadas, e cultivadas a 5% CO₂ a 37°C. Para caracterização celular foi realizada a imunofenotipagem, a qual, apresentou os anticorpos CD14⁻, CD45⁻, CD90⁺ e CD105⁺. Os ensaios de plasticidade das células resultaram na diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. O potencial de diferenciação osteogênica com o material, Laponita[®], também foi avaliado, mostrando-se capaz de induzir a diferenciação. Para o teste de citotoxicidade foi realizado o método de MTT que demonstrou aumento da viabilidade celular em todos os tempos e concentrações analisadas. Para o teste de genotoxicidade foi utilizado o ensaio cometa, evidenciando-se que a interação da célula com a Laponita[®] não apresenta diferenças estatisticamente significativas entre o índice de dano e os grupos experimentais, no entanto, quanto a frequência de dano, a Laponita[®] 6% difere quando comparada Laponita[®] 3% no maior tempo de exposição.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais; Laponita[®]; Scaffold; Toxicidade; Osteogênese.

INTRODUÇÃO

As células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) foram identificadas pela primeira vez em 2001 e desde então o tecido adiposo tem sido estudado como fonte de células para engenharia de tecidos e medicina regenerativa. As ADSC possuem marcadores de superfície celular (CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105) e não apresentam marcadores

^{1*} Correspondência: F.L.A. Cardoso. Núcleo Integrado e Morfologia e Pesquisas com Células-tronco NUPCelt, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil. f.louenny13@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8179-2561>

hematopoiéticos e endoteliais (CD14, CD31, CD34, CD45 e HLA-DR), indicando sua natureza de células-tronco mesenquimais (MSC). Além disso, são mediadoras da regeneração tecidual através da secreção de inúmeros fatores solúveis específicos (Bourin *et al.*, 2013). A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa utilizam-se das células-tronco, para substituir tecido danificado por ferimentos ou doenças. Biomateriais servem, neste contexto, para fornecer um suporte, capaz de promover o crescimento de novos tecidos por meio do fornecimento de estruturas que direcionam a função das células-tronco (Kim *et al.*, 2020).

A laponita é uma nanoargila, sintética e inorgânica de alta pureza química e consiste em aglomerados de cristais agregados de tamanho nanométrico (partículas), o que ocorre, pela atração eletrostática entre os íons de sódio (Na^+) compartilhados entre os cristais, e os elétrons neles presentes. Os cristais da laponita são discos redondos, com cerca de 25nm de diâmetro e cerca de 1nm de espessura (Tomás, Alves, Rodrigues, 2018). Os nanodiscos possuem uma densidade de $2,53 \text{ g/cm}^3$, e cada nanoplaca inclui aproximadamente 2000 células unitárias, com estrutura química de SiO_2 (66,2%), MgO (30,2%), Na_2O (2,9 %) e Li_2O (0,7%). Sendo a laponita, da classe das esmectita, possui estrutura onde cada plaqueta de nanoargila, apresenta uma camada octaédrica com átomos de magnésio (Mg) entre duas camadas tetraédricas de silício (Si), (Peraro *et al.*, 2020).

A nanopartícula de laponita aumenta significativamente a expressão gênica da fosfatase alcalina (ALP) e osteocalcina após exposição da molécula de $\text{Si}(\text{OH})_4$ presente em sua composição estrutural, revelando um aumento na diferenciação osteogênica (Reffitt *et al.*, 2003). Em estudos realizados por Mihaila *et al.* (2013) e por Gaharwar *et al.* (2013) foi investigado o efeito da laponita em células-tronco mesenquimais. Os dados manifestaram claramente a natureza intrínseca da argila, para estimular a diferenciação osteogênica na ausência de fatores de indução. Uma sequência de eventos foi desencadeada de acordo com o padrão temporal clássico de marcadores de diferenciação: aumento da atividade da ALP, regulação positiva do fator de transcrição relacionado a Runt-2 (RUNX2), deposição de proteína da matriz relacionada ao osso (osteocalcina e osteopontina) e mineralização da matriz.

Mihaila *et al.* (2014) realizaram experimentos, onde a fração vascular estromal do tecido adiposo, foi usada para isolar uma subpopulação de ADSC expressando o marcador associado à pluripotência SSEA-4 com potencial de diferenciação superior em relação à linhagem osteogênica. Nessas condições, também foi induzida a superexpressão de marcadores osteogênicos relacionados (RUNX2, osteopontina, osteocalcina), bem como aumento da

atividade de ALP, deposição de colágeno tipo I e mineralização da matriz. Em outro estudo, Wang *et al.* (2012) combinaram nanodiscos de laponita com nanofibras de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) eletrofiadas e usaram como *scaffolds* para promover o crescimento das MSC em meios de cultura sem fatores estimuladores da osteogênese. Os resultados foram semelhantes aos encontrados por Mihaila e Gahaewar e, além disso, a utilização da laponita com nanofibras de PLGA propiciou a estabilidade estrutural e as propriedades mecânicas dos hidrogéis e aumentou a adesão celular.

Considerando a biocompatibilidade e demais propriedades da laponita, esse material apresenta grande potencial em diversas áreas biomédicas (Park *et al.*, 2020). No entanto, é necessário avaliar potenciais citotóxicos que a interação laponita/ADSC poderá ocasionar. Assim, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a toxicidade em nível celular e genômico, da integração da laponita em culturas de células-tronco adipoderivadas de ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo da Laponita[®] em gel

Para a obtenção de gel, foram preparadas duas concentrações distintas, 3% (0,3g) e 6% (0,6g), adicionando-se o pó da Laponita[®] em um tubo falcon contendo 10mL de água Milli-Q[®] à 4°C e foi levada para agitação mecânica durante 15 minutos contínuos até a obtenção de um gel transparente, consistente e coloidal.

Difração de Raios-X (DRX)

A Laponita[®] foi caracterizada por meio da técnica de difração de raios-X, e os resultados foram obtidos com o difratômetro Shimadzu XDR-6000, com variação angular de 5-100 °(2 θ), radiação de CuK α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), voltagem de 40KV/30mA e velocidade de varredura de 1° min⁻¹.

Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Para a análise, foi utilizado o espectrofotômetro da marca Perkin Elmer Spectrum 100, janela de KBr. Foram realizadas 16 varreduras na faixa espectral de 650 a 4000 cm⁻¹ com resolução de 4cm⁻¹. Os espectros de varredura foram coletados e analisados com o programa FTIR Spectrum Software (Perkin-Elmer).

Análise Termogravimétrica (TGA)

A termogravimetria foi obtida pelo monitoramento da variação de massa do material em função da temperatura, usando equipamento SDT Q600-0883 (DSC-TGA) da TA Instruments, com taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, taxa de fluxo de 100mL/min^{-1} , sob atmosfera de argônio, utilizando cadinho de alumina.

Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia da Laponita[®] foi observada por meio de micrografias, realizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) com canhão de emissão por campo, de modelo Quanta FEG250 e marca FEI, tensão de aceleração de 1 a 30 kV, equipado com EDS de SDD (silicon drift detectors), marca Ametek, modelo HX -1001, detector Apollo X-SDD. As informações sobre spot, magnificação e energia estão catalogadas na parte inferior de cada micrografia.

Ensaio de Toxicidade *Artemia salina*.

O ensaio de toxicidade *Artemia salina* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Meyer (1982) e Sousa *et al.* (2021). Ovos de *Artemia salina* foram incubados em água do mar artificial. Este teste foi preparado em concentrações de (0,1mg/mL, 0,5mg/mL, 1mg/mL e 5mg/mL) da Laponita[®] em 10mL de solução salina artificial e, em seguida, 10 náuplios de *A. salina* foram adicionados a cada recipiente. Todos os testes foram realizados em triplicata e a toxicidade foi determinada de acordo com a quantidade de *A. salina* viva após 24h e 48h de contato. Durante os testes, a iluminação dos sistemas foi mantida sob condições controladas, sendo o controle negativo realizado com solução salina sintética. Para determinar a toxicidade foram utilizados o número de larvas vivas em relação as concentrações do material para calcular os valores da CL₅₀.

Aspectos Éticos e Obtenção de ADSC

Este trabalho foi aprovado pela comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí, registrado por meio do número 695/21. Para a obtenção de células-tronco derivadas do tecido adiposo subcutâneo de ratos, foram utilizados 06 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), que foram eutanasiados, seguindo a Resolução Normativa n° 37 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O tecido adiposo das regiões dorsal e inguinal foi coletado e, posteriormente, lavado em solução salina

de PBS com 10% de antibiótico.

Isolamento e Expansão das ADSC

O tecido adiposo foi disposto sobre uma placa de petri, e, fragmentado mecanicamente com auxílio de bisturi até que se formasse uma massa homogênea. Em seguida, foi centrifugado a 2.000rpm por 10 minutos a 20°C. O sobrenadante (explante) e a fração enriquecida (*Pellet*) foram coletados e cerca de 10^6 células foram plaqueadas em garrafas de 25cm² com meio de cultivo suplementado DMEM glutamax com 15% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico, 1% de glutamina e 1% de NEAA e foram mantidas em incubadora com 5% de CO₂, a 37° C com 95% de umidade. As trocas de meio eram realizadas a cada 72 horas e permaneceram até a confluência de 80% das células. Após as células atingirem a confluência foram realizadas as sucessivas repicações utilizando Tripsina 0.25% até a terceira passagem.

Morfologia e Unidade Formadora de Colônia

Para o ensaio de unidades formadoras de colônias (UFC) foi aliquoteada uma amostra de ADSC em passagem 0 (P0) e inserida em placa de cultivo de 90x15mm. Após o plaqueamento foram realizadas trocas de meio a cada 72 horas até a formação do máximo de colônias com mais de 20 células. As células foram fixadas com paraformaldeído a 4% durante 30 minutos e coradas com Giemsa por 10 minutos, posteriormente a placa foi lavada com água destilada para retirar todo o excesso de corante. As colônias foram contadas sobre a superfície da placa e mensuradas através do software ImageJ.

Caracterização Imunofenotípica

As células expandidas em terceira passagem (P3) foram tripsinizadas, centrifugadas a 2500rpm durante 10 minutos e ressuspensas com 1mL de PBS. Foram contadas em câmara de Neubauer, obtendo-se a concentração de 10^4 , e distribuídas em 5 tubos falcon, sendo uma amostra controle e as demais contendo o anticorpo CD105 (1:1), CD90 (1:200), CD14 (1:300) e CD45 (1:200). As células foram novamente centrifugadas, retirando-se o sobrenadante, e os anticorpos propostos para cada um dos marcadores foram incubados com as ADSC por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, as células foram lavadas, centrifugadas e transferidas para um tubo de citômetro. As amostras foram analisadas por meio do citômetro de fluxo (FACScanto® II) e software BD FACSDiva (Version 6.1.3). As populações foram estimadas pela porcentagem das células expressando cada um dos

marcadores em relação ao total de células adquiridas por meio do software INFINICYT (version 5.1). Os resultados foram plotados em marcação dupla.

Ensaio de Plasticidade Celular

Foram induzidas diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica em ADSC na terceira passagem (P3), utilizando StemPro™ Differentiation Kit- Gibco®, conforme protocolo do fabricante. Os poços que não receberam indução de diferenciação para nenhuma das linhagens foram destinados ao grupo controle. As células foram mantidas com meio de cultivo durante 7 dias para a diferenciação adipogênica, 14 dias para condrogênica e 21 dias para osteogênica. Para a coloração, as células foram lavadas com PBS e fixadas com formaldeído a 4% por 30 minutos. Posteriormente, foi utilizado o corante Giemsa para o controle negativo. Oil red, para evidenciar os marcadores adipogênicos: Receptor gama ativado por proliferação de peroxissoma (PPARG); Lipoproteína lipase (LPL); Proteína 4 de ligação a ácidos graxos (FABP4); Adiponectina (ADIPOQ); Leptina (LEP); Perilipina (PLIN); Fator de complemento D (CFD). O corante Alcian blue para evidenciar as marcações condrogênicas: Agrecano 1 (AGC1); biglicano (BGN); Decorin (DCN); Anexina A6 (ANXA6); Matrilina 1 (MATN1); Metaloproteinase de matriz 13 (MMP13) Sox9; Colágeno tipo II alfa 1 (COL2A1); Proteína de matriz oligomérica de cartilagem (COMP) e Alizarin red para as marcações osteogênicas: Osteocalcina (BGLAP); Osteopontina (SPP1); fator de transcrição 2 relacionado a runt (RUNX2); Endopeptidase neutra reguladora de fosfato (PHEX) (Boucher, Lakshmiathy, Vemuri, 2009; Carreros *et al.*, 2009; Carro *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Stewart, Stewart, 2011). As leituras foram realizadas por microscopia óptica.

Ensaio de Diferenciação Osteogênica induzida pela Laponita®

Para se verificar a diferenciação celular induzida pela Laponita®, as ADSC foram cultivadas em terceira passagem em placas de 12 poços com concentração celular de $0,1 \times 10^6$ em cada poço e em triplicata. Em um tubo falcon, foram preparados o meio basal StemPro™ Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium com a Laponita® nas duas concentrações. Estes meios foram usados para suplementar as células durante as trocas, substituindo o indutor StemPro™ Osteogenesis Supplement pelo biomaterial. Ademais, foi analisada a Laponita® com o indutor, para verificar o potencial de indução com o kit completo de diferenciação StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit- Gibco®. Assim, os poços foram suplementados com o meio contendo Laponita® em 3% e 6% e o meio com o kit completo

StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit- Gibco® durante 21 dias. Transcorridos os 21 dias de diferenciação, o meio de cultivo foi removido, lavado uma vez com PBS e as células foram fixadas com solução de formaldeído a 4% por 30 minutos. Após a fixação, os poços foram lavados com água destilada e preenchidos com solução de Alizarin Red por 10 minutos. Os poços foram avaliados por microscopia óptica.

Análise de citotoxicidade da Laponita® sobre ADSC

Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram cultivadas em placas de 96 poços contendo 10µl de células (10^4) e 90µl de meio DMEM suplementado. Após a aderência das células aos poços foi inserida a Laponita® em suas respectivas concentrações. As células e o material foram cultivados em triplicata, para o branco, grupo controle, Laponita® a 3% e Laponita® a 6%. Os resultados de citotoxicidade foram realizados em 24, 48 e 72 horas pelo método de MTT. O meio de cultivo foi substituído por solução de brometo de MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) e DMEM High Glucose. As placas foram incubadas por 4 horas a 37°C com 5% de CO₂ e após esse período, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100µL de DMSO. A placa permaneceu em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente para dissolução completa do formazan, sendo realizada a leitura a 570nm em leitora de microplaca Biotek (modelo ELx800). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade por meio da média das absorbâncias dos tratados/média dos controles x100, de acordo com Wang *et al.* (2011).

Teste de Genotoxicidade por Ensaio Cometa

A versão alcalina do ensaio cometa foi realizada conforme descrito por Speit e Rothfuss (2012). Após os tempos de tratamentos concluídos, alíquotas de 10µL de suspensão de Células-tronco mesenquimais adipoderivadas foram misturadas com uma fina camada de agarose de baixo ponto de fusão 0,75% (90µL) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal 1,5%. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10, com adição de 1% Triton X-100 e 10% de DMSO na hora do uso), por até 72 horas a 4°C. Após esse período, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH>13) por 20 minutos, e, em seguida, expostas a uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) por 15 minutos em cuba de eletroforese. Por fim, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (0,4 M e pH 7,5) e coradas com solução de prata. As lâminas foram analisadas quanto ao perfil fotomicrográfico das células (aumento

de 400X em microscópio óptico) e os resultados, expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD) de 100 células em triplicata por tratamento. O ID foi calculado por meio da fórmula: $ID = \sum (\text{número de células em determinada classe de dano} \times \text{classe de dano})$, que variou de 0 a 400 e FD pela seguinte fórmula: $FD = 100 - \text{n}^\circ \text{ de células classe } 0$.

Análise estatística

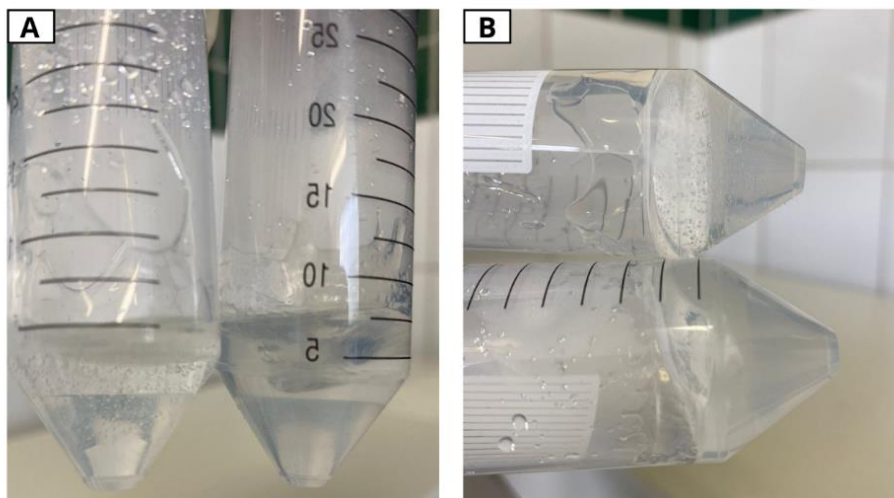
Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. As análises, realizadas no software GraphPad Prism (versão 8.0) por meio da análise de variância (ANOVA) One-Way com pós-teste de *Turkey*, considerando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Laponita[®] em Gel

Após agitação e hidratação, foi possível obter um gel transparente e coloidal (Figura 6A). A transparência é um indicativo da dispersão uniforme e compatibilidade dos nanomateriais e, de acordo com a literatura, quanto menor for as partículas de uma dispersão, maior será sua transparência (Pujala, 2014; Silva, 2018). A Laponita[®] apresentou baixa viscosidade, no entanto, esta dispersão passa a ser mais viscosa ao longo do tempo até atingir um estado em que ao ser girada lateralmente não ocorre o escoamento da matéria (Figura 6B). Esta transição líquido-sólido que ocorre com a dispersão é chamada de envelhecimento e, se dá devido às interações atrativas e repulsivas que ocorrem entre os nanodiscos de Laponita carregados eletricamente (Pujala, 2014; Braga, 2019).

Figura 6: Laponita após hidratação e agitação



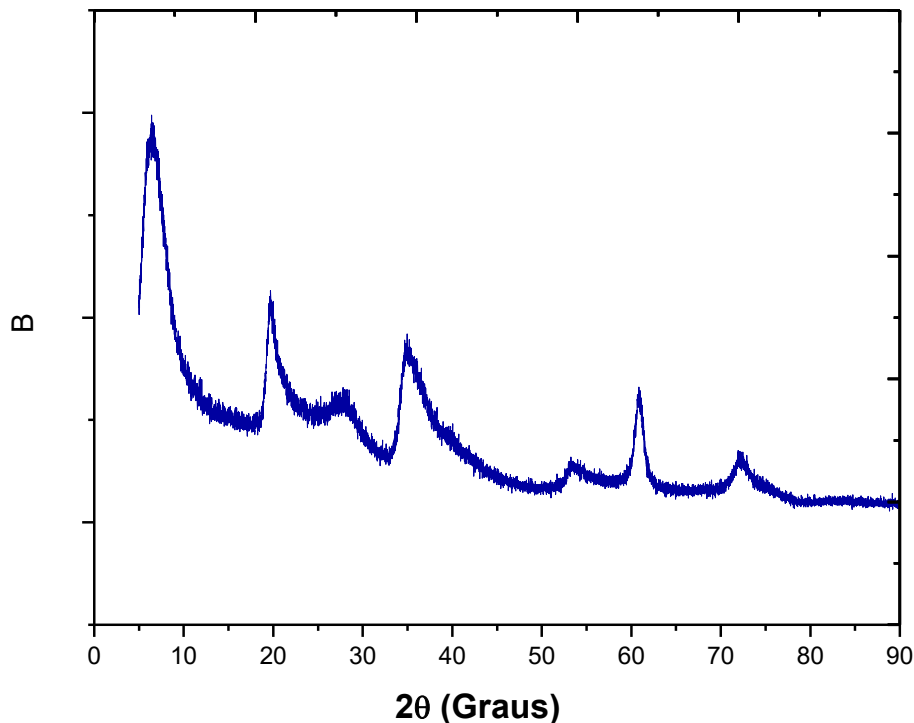
Fonte: Elaborado pela autora (2023). (A) Laponita[®] após a hidratação e agitação, à esquerda 3% e a direita 6%;

(B) Dispersão da Laponita[®] chamado de envelhecimento, acima 3% e abaixo 6%.

Difração de Raios-X

Os dados obtidos por difração de raios -X (Figura 7) mostram os picos característicos da Laponita[®] em $2\theta = 20^\circ$ e $2\theta = 35^\circ$ os quais, são equivalentes ao plano cristalino, e devido a essa propriedade, é possível inferir que as partículas são organizadas num padrão tridimensional bem definido e possuem estabilidade. Outro pico encontrado foi em $2\theta = 60,9^\circ$ indicando a presença de uma estrutura trioctaédrica, típica da Laponita[®] (Bippus, Jaber, Lebeau, 2009).

Figura 7: Caracterização por DRX da Laponita[®]



Fonte: Elaborado pela autora (2023). DRX com picos característicos da Laponita[®] em $6,5^\circ$, 20° , 35° e $60,9^\circ$.

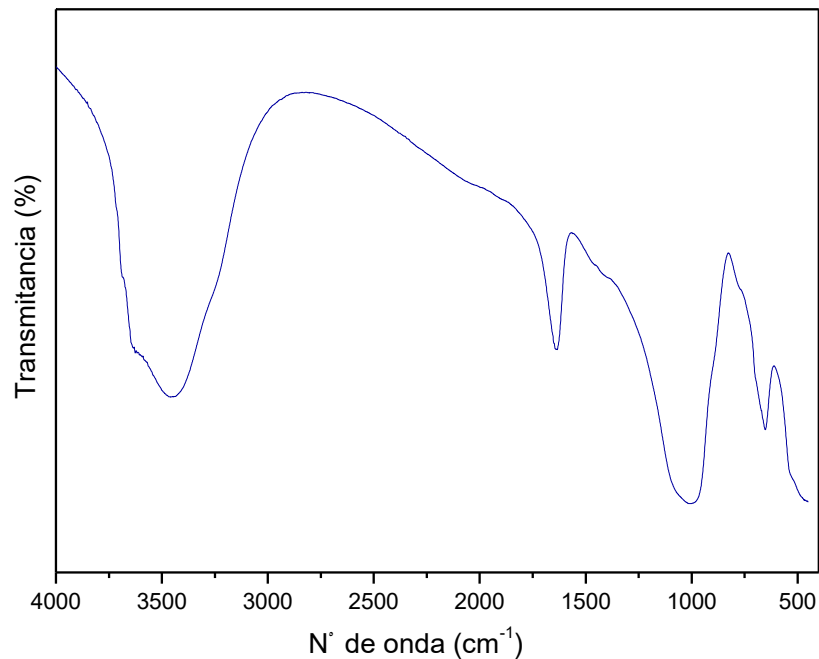
Observou-se ainda uma reflexão visível distinta em $2\theta=6,5^\circ$, $d(001)=14\text{\AA}$ devido à natureza hidrofílica das argilas intercaladas com íons de metais alcalinos. O difratograma de argilas puras, geralmente, apresenta um pico largo acima do pico do espaçamento basal, relacionado apenas à presença de íons Na^+ ($2\theta/\text{graus}=6,75^\circ$; $d001=13,1\text{\AA}$). Esse fenômeno é ocasionado pela presença de uma pseudo-camada de moléculas de água (valor próximo a $2,5\text{\AA}$ de espessura) que rodeia os cátions presentes no domínio interlamelar, acarretando aumento no espaçamento basal detectado, em acordo com dados da literatura (Roosbahani, Kharaziha,

Emadi, 2017; Zeynabad, Salehi, Mahkam, 2017).

Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de infravermelho relacionado à Laponita[®] é observado na (Figura 8). Dentre as vibrações analisadas, verifica-se uma banda mais larga, característica do argilomineral em 3500cm^{-1} , referente às vibrações de estiramento das ligações dos grupamentos Si-OH e Mg-OH, que podem estar associados a grupos hidroxilas de moléculas de água adsorvida na superfície do argilomineral, dada sua grande higroscopia (Roozbahani, Kharaziha, Emadi, 2017; Mittal, Al Alili, Alhassan, 2020).

Figura 8: Análise gráfica da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.



Fonte: Elaborado pela autora (2023). FTIR representando as bandas características da estrutura química da Laponita[®] em 3500cm^{-1} , 1637cm^{-1} , entre 1060 e $962,99\text{cm}^{-1}$, 650cm^{-1} e 456cm^{-1} .

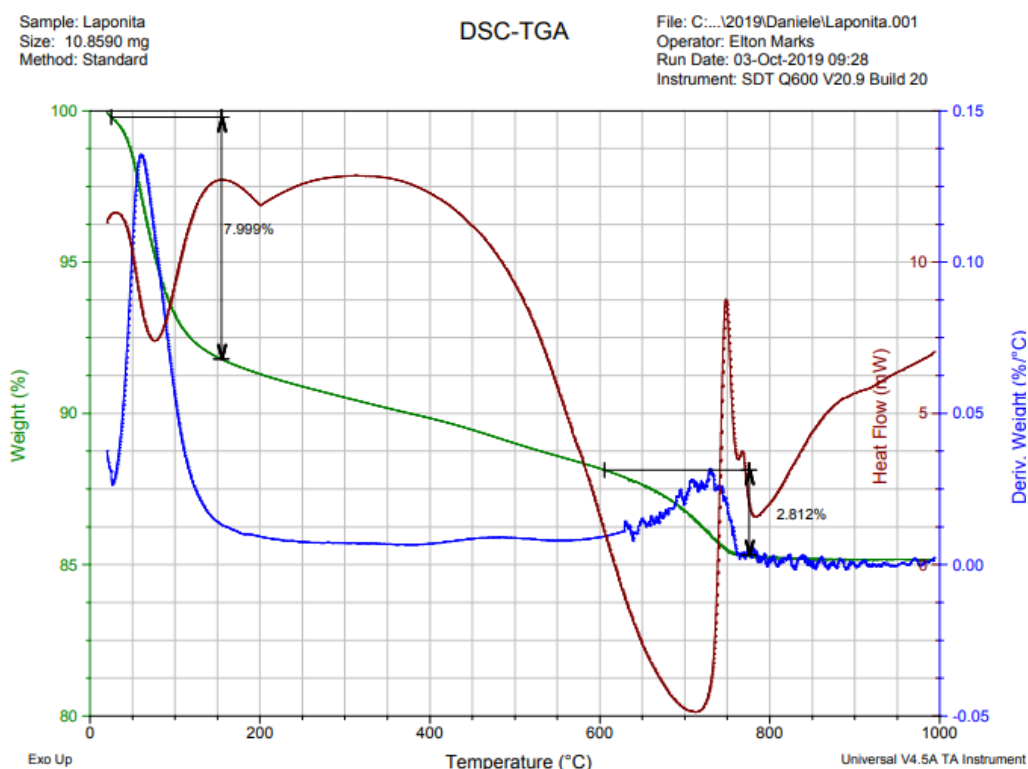
Em 456cm^{-1} observa-se uma deformação axial fora do plano referente a ligação Mg-O (Nascimento *et al.*, 2017). Ainda, uma banda espectroscópica intensa em $962,99\text{cm}^{-1}$ e 1060cm^{-1} atribuída à vibração de alongamento das ligações aos grupos (Si-O) e (Si-O-Si) que se refere à deformação axial dos grupamentos, pois as vibrações dos grupos Si-O na Laponita[®] estão associadas à presença de grupos oxigênio, na forma basal (O-Si-O), entre as placas tetraédrica e octaédrica na Laponita[®] (Mittal, Al Alili, Alhassan, 2020). Em 650cm^{-1} observa-

se uma banda referente à deformação angular da hidroxila da água absorvida na nanoargila relativa ao estiramento simétrico da ligação Si-O da argila. A banda 1637 cm^{-1} , é devido a flexão O-H estrutural e hidratação (Nair *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2017).

Análises Térmicas (DSC e TGA)

Os resultados da Laponita[®] apresentaram dois eventos distintos (Figura 9), o primeiro aparece em uma faixa de temperatura entre aproximadamente 59°C , com perda de massa de 7,99%, que corresponde a liberação de moléculas de água adsorvidas presentes no domínio interlamelar e na superfície externa das lamelas e/ou outros voláteis. O segundo, na faixa de 727°C com perda de massa de 2,8%, sendo correlacionado a perda de peso, devido ao processo de desidroxilação dos grupos hidroxila presentes nas bordas das plaquetas e na massa das partículas, respectivamente. As perdas de massa descritas anteriormente são comumente encontradas na literatura (Pálková *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2019).

Figura 9: Análises Térmicas DSC-TGA

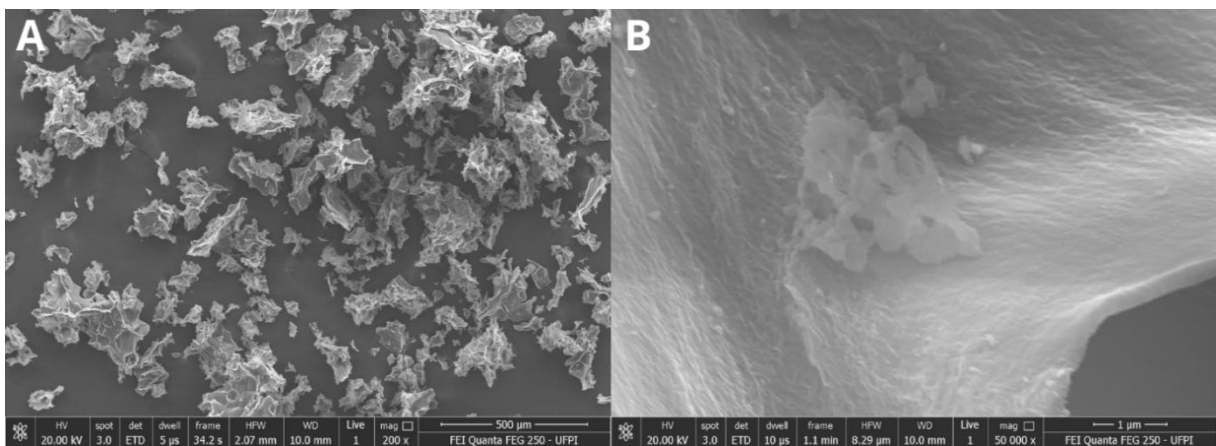


Fonte: Elaborado pela autora (2023). Análise térmica da Laponita[®] com eventos de perda de massa de 7,99% em 59° e de 2,8% em 727° .

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, permitiram observar grandes agregados da Laponita[®], com diferentes tamanhos de partículas e de formatos irregulares, entre 4 e 70µm (Figura 10A e 10B). Foi possível ainda, verificar que, a Laponita[®] é formada por aglomerados micrométricos, semelhantes aos observados por Bippus; Jaber; Lebeau (2009) e Valencia *et al.* (2018). A morfologia apresentada pela Laponita[®] foi de superfícies heterogêneas com variações de densidade (Roseti *et al.*, 2017).

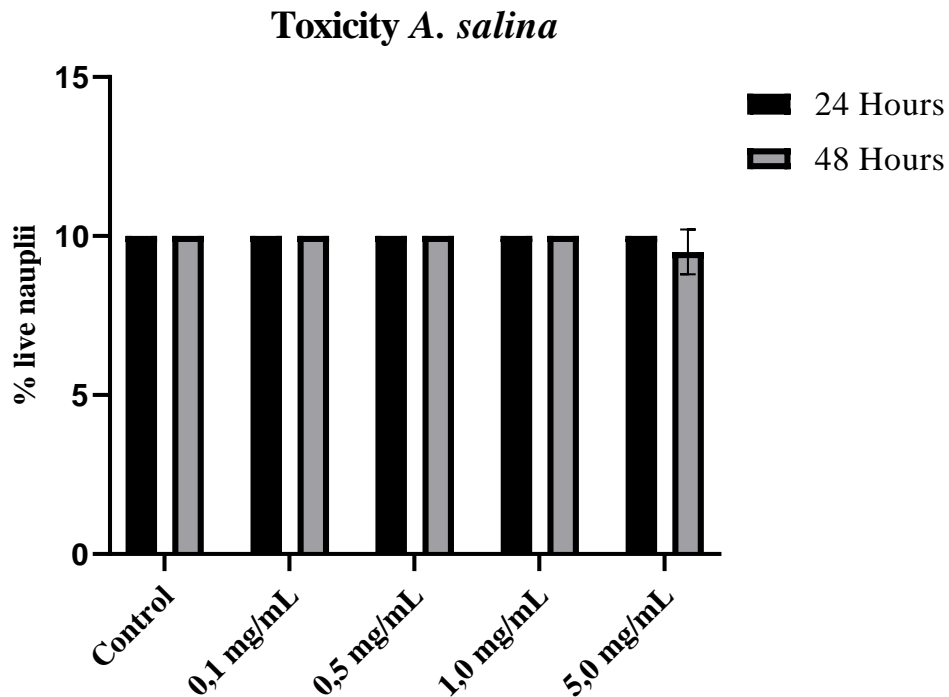
Figura 10: Micrografias da Laponita[®] por microscopia eletrônica de varredura



Fonte: Elaborado pela autora (2023). (A) Micrografias mostrando agregados de Laponita[®], com diferentes tamanhos de partículas e de formatos irregulares, entre 4 e 70 µm. (B) Micrografias mostrando agregados de Laponita[®] em maior aumento.

Toxicidade por *Artemia Salina*.

Neste ensaio, a Laponita[®] não apresentou toxicidade nas diferentes concentrações analisadas (Figura 11). No entanto, na concentração de 5mg/mL em 48 horas de ensaio houve uma redução na população de náuplios, porém, os resultados apresentados foram abaixo da CL₅₀. Com base nesses resultados, pode-se considerar que a Laponita[®] apresenta baixa toxicidade nas concentrações testadas (Meyer *et al.*, 1982; Sousa *et al.*, 2021). Porém, apesar do teste ser considerado extremamente útil e versátil, pois possui aplicabilidade em diversas áreas do conhecimento, ressalta-se que é um teste de triagem, e para uso em terapia celular, outras metodologias são mais reprodutíveis.

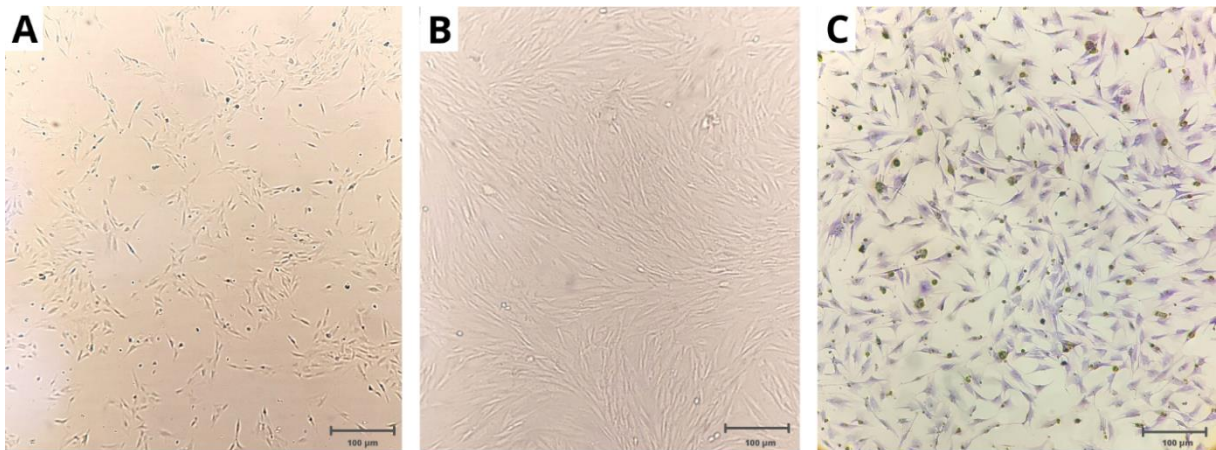
Figura 11: Ensaio de toxicidade por *Artemia salina*

Fonte: Elaborado pela autora (2023). Gráfico mostrando a quantidade de náuplios vivos (eixo y) em 24 e 48 horas e as concentrações testadas (eixo x).

Morfologia e Unidade Formadora de Colônia- UFC

O processo de isolamento das ADSC mostrou adesão à superfície plástica e morfologia celular de fusiforme a fibroblastoíde em todas as amostras. As primeiras células plástico aderentes, com morfologia fibroblastóide foram visualizadas aos 8 dias de cultivo celular, as primeiras colônias, se formando aos 12 dias (Figura 12A) e a confluência de 80% (Figura 12B) da área da garrafa, constatada aos 14 dias de cultivo. Quanto à expansão celular não foi apresentada alteração na morfologia, e as células seguiram as características padrão de aderência celular, a morfologia fibroblastóide, exibindo núcleos esféricos e proliferação em monocamada, o comprimento médio de $74,45 \pm 9,31\mu\text{m}$ e largura média de $18,79 \pm 3,55\mu\text{m}$. Pelo ensaio de unidades formadoras de colônias (UFC) foi possível observar a formação de 124 colônias bem definidas. Após coloração com Giemsa, as células apresentaram-se basofílica e forte interação entre si (Figura 12C).

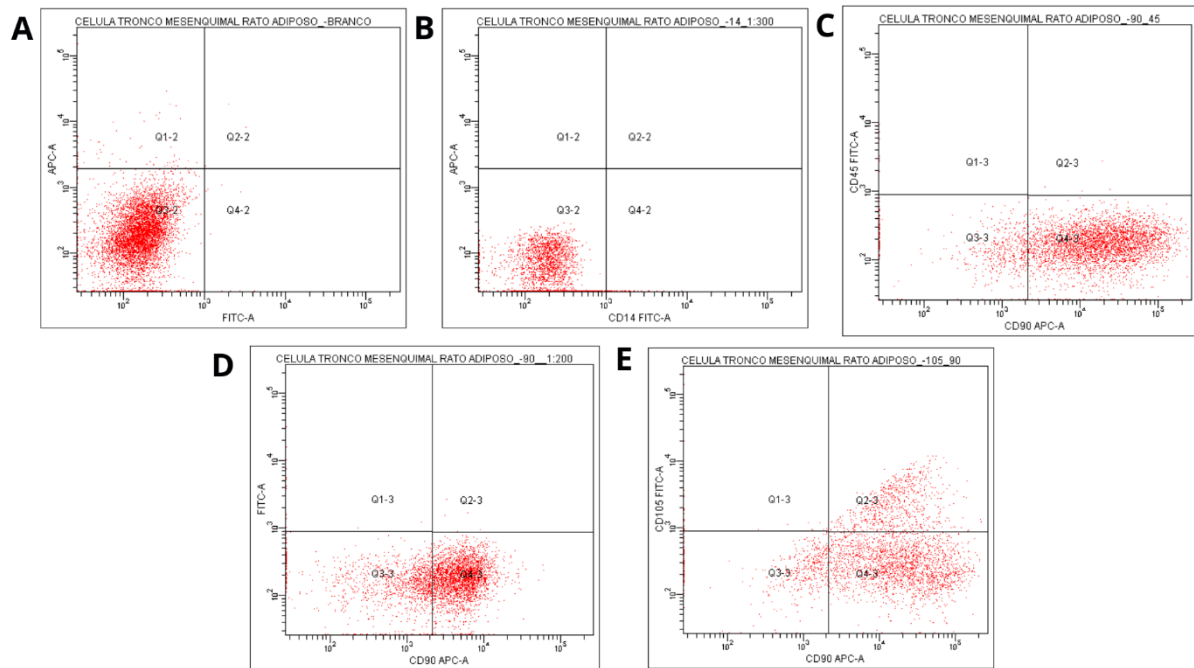
Figura 12: Formação de colônias e morfologia das células-tronco mesenquimais



Fonte: Elaborado pela autora (2023). (A) ADSC iniciando a formação de colônias de células (UFC) (obj. de 10x); (B) ADSC com 80% de confluência e formando uma monocamada de células (obj. de 10x) (C) ADSC evidenciando através da coloração de Giemsa a morfologia fibroblastóide (obj. de 10x).

Caracterização Imunofenotípica

As células-tronco derivadas do tecido adiposo de rato Wistar demonstraram ausência de expressão do marcador de progenitores hematopoéticos CD14 (Figura 13B). Ainda, ausência para CD45 (Figura 13C), marcador expresso na superfície de todos os leucócitos humanos, excluindo a possibilidade da presença dessas células no cultivo celular (Kaewkhaw *et al.*, 2011). Na figura 13D é apresentado as células pertencentes ao CD90, no qual possui marcação positiva. O CD90 é uma molécula localizada na parte externa da membrana celular, com expressão e regulação específicas, para alguns tipos celulares, dentre eles, as células-tronco. Essa glicoproteína tem variadas funções: sinalização, adesão, proliferação e modificações morfológicas celulares (Shahar *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2017). Outra marcação positiva apresentada foi para o CD105 (Figura 13E) que é uma glicoproteína de membrana celular encontrada em células endoteliais em formação, células estromais e células mesenquimais, sendo considerado um marcador de neovascularização. Além disso, é um dos marcadores estabelecidos como expresso por células mesenquimais, devido à origem mesenquimal dos vasos sanguíneos, e é amplamente demonstrado na literatura em culturas de células-tronco (Gronthos *et al.*, 2001; Ranjbaran *et al.*, 2017). Embora o CD105 seja considerado um importante marcador de células-tronco mesenquimais, alguns artigos demonstram que sua expressão varia, dependendo do tecido de origem no qual foram isoladas, o tempo de cultura *in vitro*, a confluência e o estado de diferenciação das células (Gaebel *et al.*, 2011; Anderson *et al.*, 2013).

Figura 13: Imunofenotipagem das ADSC

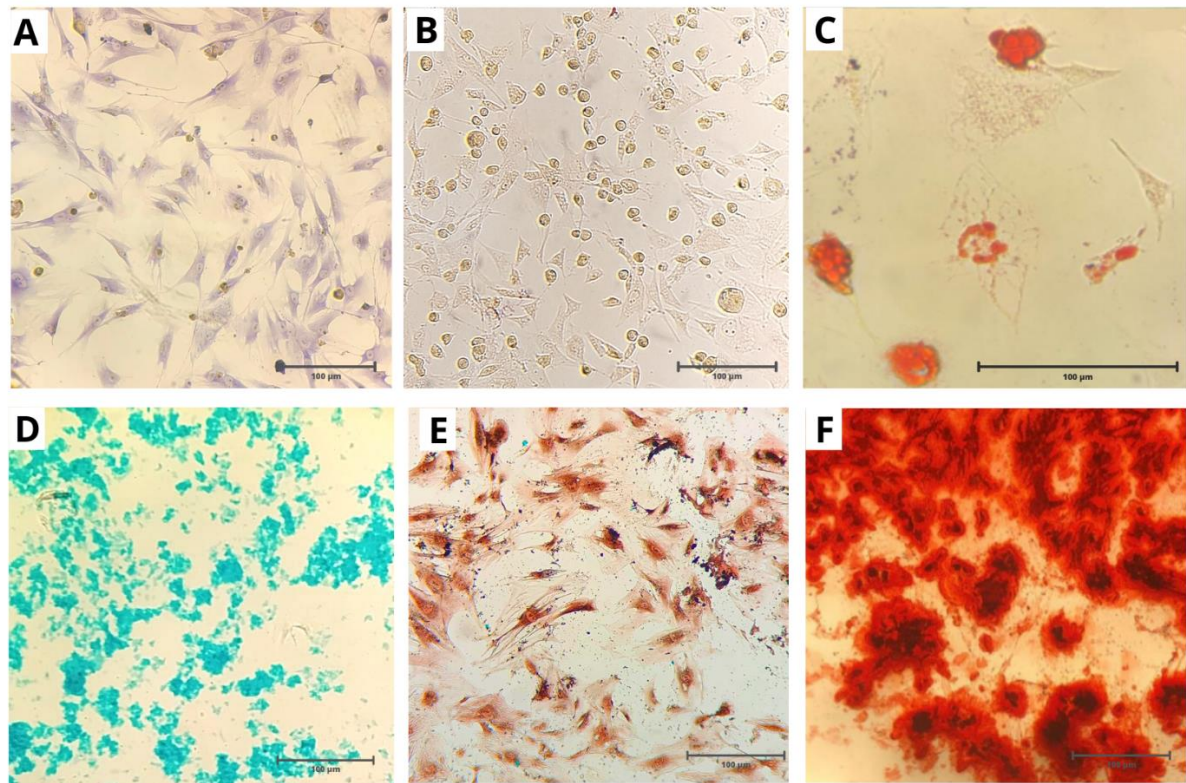
Fonte: Elaborado pela autora (2023). Gráfico com a imunofluorescência para os anticorpos CD14 (8B), CD45 (8C), CD90 (8D), CD105 (8E) e Branco (8A).

Plasticidade Celular

A partir do quinto dia de indução adipogênica, pequenas alterações morfológicas começaram a ser observadas (Figura 14B) em relação ao grupo controle (indiferenciadas) (Figura 14A). As células adquiriram um aspecto mais arredondado e algumas apresentavam morfologia mais achatada, sendo observada uma dilatação da área citoplasmática próximo ao núcleo. Após o sétimo dia de indução, foi realizada a coloração e foi possível evidenciar os marcadores adipogênicos através das gotículas de gordura coradas de vermelho (Figura 14C). Na diferenciação condrogênica, as ADSC apresentaram um achatamento do citoplasma, perdendo a morfologia fibroblastóide. Após os 14 dias e os poços serem corados, foi possível destacar, as marcações condrogênicas que se coram de azul no interior do citoplasma e na matriz extracelular (Figura 14D). As células induzidas para diferenciação osteogênica apresentaram mudanças morfológicas, a partir do nono dia de indução, em comparação ao grupo controle. Foi possível observar espaços mais amplos entre as células e posteriormente apareceram acúmulos de material esbranquiçado, que se assemelhava a depósitos de cálcio, e continuou, até o vigésimo primeiro dia de indução. Essa diferenciação foi avaliada pela coloração histoquímica, que indicou as marcações osteogênicas presentes após 21 dias. A concentração

de vermelho de Alizarin red foi qualitativamente avaliada nos diferentes grupos deste estudo. Em algumas regiões do poço apresentavam coloração com menor intensidade da marcação (Figura 14E), enquanto em outras localizações eram evidentes a coloração forte identificando nódulos mineralizados e intensa formação de tecido calcificado (Figura 14F). Desta forma, a avaliação qualitativa dos marcadores evidencia-se que o grupo de células estudadas, trata-se de células-tronco mesenquimais, pois segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISTC) uma determinada população de células será classificada como célula-tronco mesenquimal quando possuir a capacidade de diferenciar-se em linhagens adipogênica, condrogênicas e osteogênica.

Figura 14: Ensaio de plasticidade das células-tronco mesenquimais

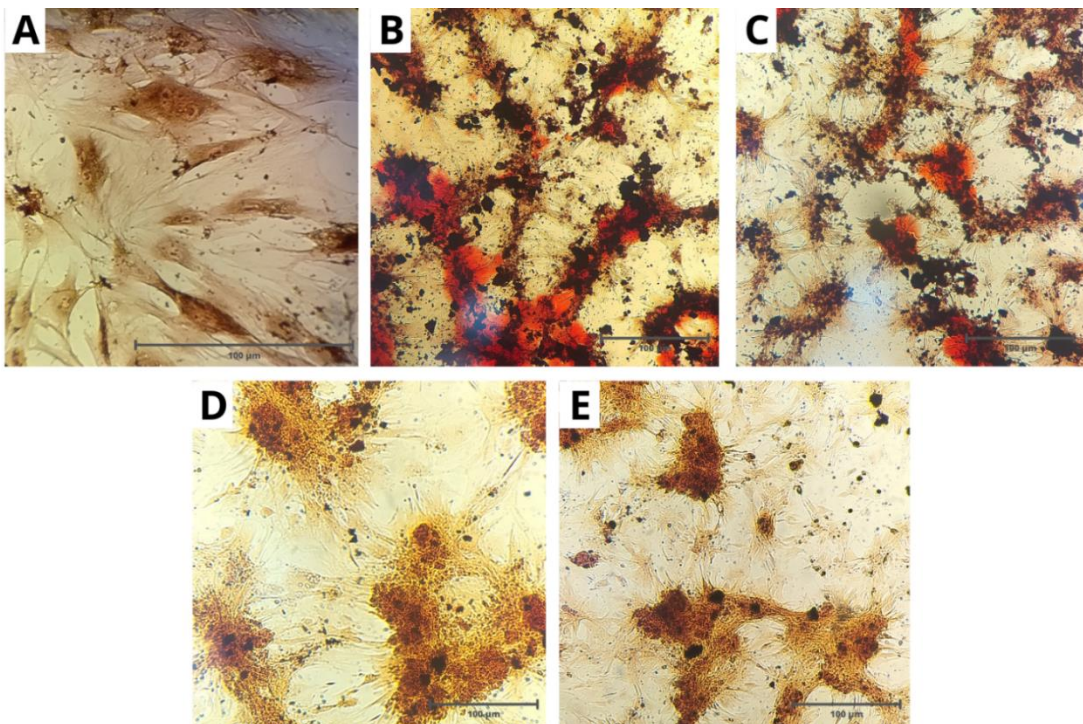


Fonte: Elaborado pela autora (2023). (A) Controle Negativo (células indiferenciadas) evidenciando através da coloração de Giemsa a morfologia fibroblastóide das ADSC (obj. de 20x); (B) ADSC com 5 dias de indução (obj. de 20x) (C) ADSC após a coloração com Oil red evidenciando as gotículas de lipídeos que se coram de vermelho (obj. de 40x). (D) ADSC após coloração com Alcian Blue destacando-se o acúmulo de proteoglicanos (coloração azul) (obj. 20x). (E) ADSC após coloração com alizarin red e discreta síntese de formação osteogênica (obj.20x); (F) ADSC após coloração com alizarin red e intensa síntese de formação osteogênica com presença de nódulos mineralizados (obj. 40x).

Diferenciação Osteogênica induzida pela Laponita®

Ao longo dos primeiros dias, as células induzidas para diferenciação osteogênica começam a apresentar as mesmas características morfológicas em comparação ao grupo controle (células sem o material e com indução). A partir do oitavo dia de cultivo tanto o controle quanto os poços com o material, apresentaram espaços mais amplos entre as células. No entanto, é relevante destacar que os poços que continha a Laponita® e o meio de indução, não apresentaram espaços no meio e as ADSC formaram uma espécie de colônia se interligando umas as outras. Posteriormente, destacaram-se acúmulos de material esbranquiçado, semelhante a depósitos de cálcio, de maior intensidade nos poços com Laponita® e indução, que nos demais poços, e seguiu até o vigésimo primeiro dia de indução. Ao avaliar os poços, foi observado que, todos apresentaram diferenciação osteogênica, tanto o grupo controle (Figura 15A), quanto a Laponita® 3% e 6% com indução (Figura 15B e 15C), e Laponita® 3% e 6% sem indutor (Figura 15D e 15E).

Figura 15: Ensaio de Diferenciação Osteogênica induzida pela Laponita®



Fonte: Elaborado pela autora (2023). (A) Controle Negativo (células sem o material e com indução) após coloração com alizarin red evidenciando discreta formação osteogênica (obj. de 40x); (B) Diferenciação Laponita® 3% com indutor após coloração com alizarin red e intensa síntese de formação osteogênica (obj.20x); (C) Diferenciação Laponita® 6% com indutor após coloração com alizarin red e intensa síntese de formação osteogênica (obj.20x); (D) Diferenciação Laponita® 3% sem indutor após coloração com alizarin red e discreta síntese de formação osteogênica (obj.20x); (E) Diferenciação Laponita® 6% sem indutor após coloração com

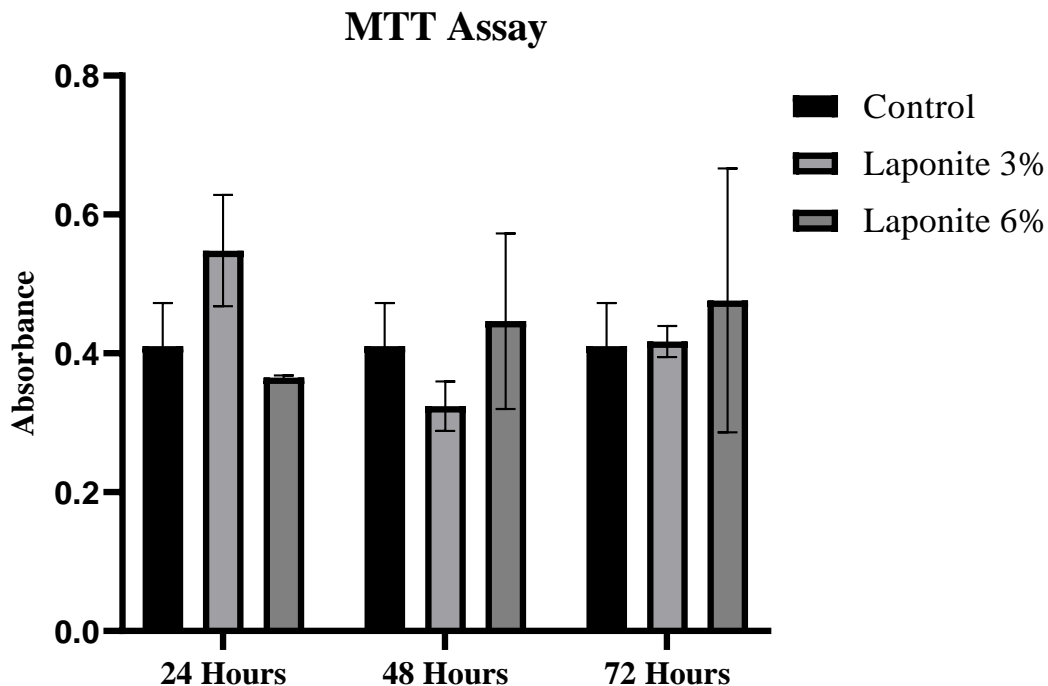
alizarin red e discreta síntese de formação osteogênica (obj.20x).

É importante ressaltar que possivelmente a Laponita[®] 3% e a Laponita[®] 6% com presença do indutor no meio, potencializou a diferenciação osteogênica, devido a intensidade na coloração com Alizarin red mostrando que nessa área com evidente coloração em vermelho (Figura 15B e 15C) há uma possível formação de tecido calcificado, justificável através de nódulos mineralizados identificados pela coloração com Alizarin red, semelhantes aos resultados obtidos por Mihaila *et al.* (2013) e por Gaharwar *et al.* (2013).

Citotoxicidade da Laponita[®] sobre ADSC

A avaliação da citotoxicidade da Laponita[®] sobre as ADSC pelo MTT, demonstrou que, em todos os grupos estudados houve aumento da capacidade de conversão do MTT em cristais de formazan, ao longo do tempo de cultivo (Figura 16).

Figura 16: Análise de citotoxicidade da Laponita[®] sobre ADSC por MTT.



Fonte: Elaborado pela autora (2023). Viabilidade das ADSC em diferentes concentrações da Laponita[®] e em diferentes tempos pela metodologia de MTT.

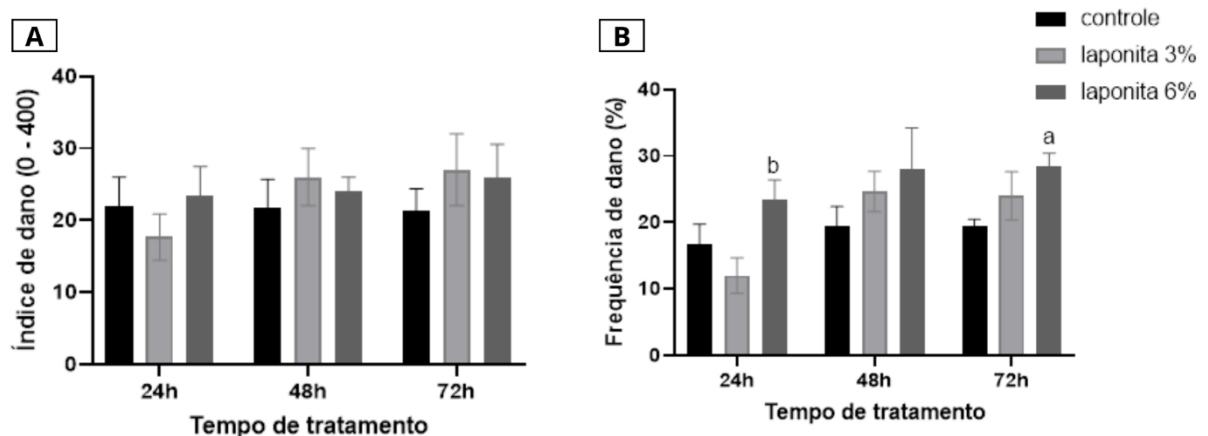
Obteve-se em 24 horas de cultivo um aumento da viabilidade celular de 133,6% para os poços com Laponita[®] 3% em relação ao grupo controle, e para os poços com Laponita[®] 6% a

viabilidade foi de 89% ($p < 0,05$). Os resultados para 48 horas de cultivo foram de 79% para os poços com Laponita[®] 3% e 108,7% para os poços com a Laponita[®] 6% ($p < 0,05$). Quando mantidas em 72 horas de cultivo as ADSC apresentaram uma viabilidade de 101,7% para os poços com Laponita[®] 3%, e para os poços com Laponita[®] 6% a viabilidade foi de 116% (Figura 15) ($p < 0,05$). Com base nesses resultados, pode-se inferir que nenhuma das concentrações do biomaterial apresentou efeito tóxico pelo método de MTT. Pois, de acordo com a norma ISO10993-5 (2009) a viabilidade celular de materiais classificados como não citotóxicos deve ser superior a 75%, os ligeiramente citotóxicos, entre 50% a 70%, e os materiais considerados muito citotóxicos, quando a viabilidade é inferior a 25%. Portanto, a Laponita[®] apresentou resultados superiores a 75%, sendo a sua maioria, acima de 100%, demonstrando que o aumento da viabilidade celular, ocorre em consequência da expansão das células em contato com a Laponita[®], que favoreceu a proliferação celular.

Teste de Genotoxicidade por Ensaio Cometa

As variações do índice de dano em função das concentrações da Laponita[®] (3% e 6%) e tempo de exposição (24, 48 e 72 horas) estão representados na Figura 11A. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o ID e os grupos experimentais.

Figura 17: Efeitos genotóxicos (índice de dano e frequência de dano).



Fonte: Elaborado pela autora (2023). (A) índice de dano; (B) frequência de dano. Os valores foram expressos em média \pm desvio padrão usando anova one-way com teste de Tukey. ^a diferente quando comparado ao controle negativo. ^b diferente quando comparado a Laponita[®] 3%.

A análise indica, que há uma tendência geral de aumento, porém não houve diferenças significativas entre as concentrações, e os tempos de exposição ($p < 0,05$). Em relação à

frequência de danos, os dados agrupados pelos tratamentos com diferentes tempos e concentrações da Laponita[®], indicaram diferenças significativas ($p < 0,01$) no tratamento principal Laponita[®] e secundário tempo. Por meio da análise estatística verifica-se essas diferenças, na figura 11B, identificado por “a” os dados obtidos, diferem quando comparado ao controle negativo. Quando representados por “b” diferem quando comparado a Laponita[®] 3% (Figura 11B). Desta forma, apesar do resultado ter apresentado baixa genotoxicidade do material, houve uma frequência de danos aos grupos expostos das ADSC, que apresentaram tendência de aumento em função das concentrações e do tempo. Em um estudo realizado por Paolo (2006) no qual foram analisadas todas as etapas do ensaio cometa, foi possível observar que há diversas variáveis que interferem diretamente nos resultados, como o período de incubação na solução de lise, a voltagem e o período da eletroforese e o pH alcalino. Assim, esses dados podem sugerir novas abordagens para analisar a possível genotoxicidade do material em intervalos de exposições maiores e utilizando outras metodologias como o ensaio de micronúcleo.

CONCLUSÃO

Os parâmetros utilizados neste estudo, indicam que a Laponita[®] é um biomaterial promissor para a engenharia de tecidos devido a sua baixa toxicidade, observada tanto na triagem com *Artemia salina*, quanto nos testes de MTT. A Laponita[®] demonstrou viabilidade celular *in vitro*, e proliferação celular, além disso, a Laponita[®] foi capaz de induzir a osteogênese sem indução no meio e potencializou os resultados com indutor. A genotoxicidade entre a interação da célula com a Laponita[®] não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre o índice de dano e os grupos experimentais, porém, quanto a frequência de dano, a Laponita[®] 6% difere quando comparada Laponita[®] 3% em maior tempo de exposição. Dessa forma, mais estudos são necessários para avaliar o uso como biomaterial, além de investigar a atividade da ALP, dentre outros marcadores osteogênicos durante a diferenciação celular.

AGRADECIMENTOS

Ao Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt/UFPI), onde foi realizado todo o ensaio celular. Ao Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAv/UFPI) pela disponibilidade da Laponita[®] e auxílio nos ensaios físico-

químicos do material. Ao Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular (LIB/UFPI), os ensaios de imunofenotipagem. Ao Laboratório de Genética Toxicológica (LAPGENIC/UFPI) pelo apoio ao ensaio de genotoxicidade. Apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- Processo N.306793/2018-0).

REFERÊNCIAS

Anderson P, Carrillo-Gálvez AB, García-Pérez A, Cobo M, Martín F. CD105 (endoglin)-negative murine mesenchymal stromal cells define a new multipotent subpopulation with distinct differentiation and immunomodulatory capacities. *PLoS One*. 2013 Oct 4;8(10):e76979.

Bippus L, Jaber M, Lebeau B. Laponite and hybrid surfactant/laponite particles processed as spheres by spray-drying. *New Journal of Chemistry*. 2009;33(5):1116.

Boucher S, Lakshmipathy U, Vemuri M. A simplified culture and polymerase chain reaction identification assay for quality control performance testing of stem cell media products. *Cytotherapy*. 2009;11(6):761-7, 767.e1-2.

Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013 Jun;15(6):641–8.

Braga AS, Estudo das Propriedades Ópticas e Elétricas dos Sistemas Laponita e Nanocompósitos de Laponita/Pontos Quânticos [dissertação de mestrado]. Lavras-MG: Universidade Federal de Lavras, 2019.

Carreras J, Lopez-Guillermo A, Roncador G, Villamor N, Colomo L, Martinez A. et al. High Numbers of Tumor-Infiltrating Programmed Cell Death 1–Positive Regulatory Lymphocytes Are Associated With Improved Overall Survival in Follicular Lymphoma. *Journal Of Clinical Oncology*. 2009 Mar;20;27(9):1470-6.

Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, Bollo RJ, Zhao X, Snyder EY, Sulman EP, Anne SL, Doetsch F, Colman H, Lasorella A, Aldape K, Califano A, Iavarone A. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature*. 2010 Jan 21;463(7279):318-25.

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*. 2004 Mar;26(3):249-61.

Gaebel R, Furlani D, Sorg H, Polchow B, Frank J, Bieback K, Wang W, Klopsch C, Ong LL, Li W, Ma N, Steinhoff G. Cell origin of human mesenchymal stem cells determines a different healing performance in cardiac regeneration. *PLoS One*. 2011 Feb 10;6(2):e15652.

Gaharwar AK, Mihaila SM, Swami A, Patel A, Sant S, Reis RL, et al. Bioactive silicate nanoplatelets for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Adv Mater*. 2013 Jun 25;25(24):3329-36.

Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*. 2001 Oct;189(1):54-63.

Huang B, Zhang H, Gu L, Ye B, Jian Z, Stary C, Xiong X. Advances in Immunotherapy for Glioblastoma Multiforme. *J Immunol Res*. 2017;2017:3597613.

International Organization for Standardization (ISO). ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices – Tests for in vitro cytotoxicity. 2009

Kaewkhaw R, Scutt AM, Haycock JW. Anatomical site influences the differentiation of adipose-derived stem cells for Schwann-cell phenotype and function. *Glia*. 2011 May;59(5):734-49.

Kim YH, Yang X, Shi L, Lanham SA, Hilborn J, Oreffo ROC, et al. Bisphosphonate nanoclay edge-site interactions facilitate hydrogel self-assembly and sustained growth factor localization. *Nat Commun*. 2020 Mar 13;11(1):1365.

Lee J, Jung E, Lee J, Huh S, Kim YS, Kim YW, Kim YS, Park D. Anti-adipogenesis by 6-thioinosine is mediated by downregulation of PPAR gamma through JNK-dependent upregulation of iNOS. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Feb;67(3):467-81.

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med*. 1982 May;45(5):31-4.

Mihaila SM, Frias AM, Pirraco RP, Rada T, Reis RL, Gomes ME, et al. Human adipose tissue-derived SSEA-4 subpopulation multi-differentiation potential towards the endothelial and osteogenic lineages. *Tissue Eng Part A*. 2013 Jan;19(1-2):235-46.

Mihaila SM, Gaharwar AK, Reis RL, Khademhosseini A, Marques AP, Gomes ME. The osteogenic differentiation of SSEA-4 sub-population of human adipose derived stem cells using silicate nanoplatelets. *Biomaterials*. 2014 Nov;35(33):9087-99.

Mittal H, Al Alili A, Alhassan SM. Solid polymer desiccants based on poly(acrylic acid-co-acrylamide) and Laponite RD: Adsorption isotherm and kinetics studies. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2020 Aug 20;599:124813.

Nair BP, Sindhu M, Nair PD. Polycaprolactone-laponite composite scaffold releasing strontium ranelate for bone tissue engineering applications. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016 Jul 1;143:423-430.

Nascimento DWS, de Moura MR, Mattoso LHC, Aouada FA. Hybrid Biodegradable Hydrogels Obtained from Nanoclay and Carboxymethylcellulose Polysaccharide: Hydrophilic, Kinetic, Spectroscopic and Morphological Properties. *J Nanosci Nanotechnol*. 2017 Jan;17(1):821-27.

Pálková H, Madejova J, Zimowska M, Serwicka E. Laponite-derived porous clay heterostructures: II. FTIR study of the structure evolution. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2010 Feb 1;127(3):237-44.

Paolo CD, Aplicação do Ensaio Cometa a estudos de danos ao DNA de robalos *Centropomus parallelus* (Poyer 1980), expostos à β -naftoflavona

Park K, Dawson JI, Oreffo ROC, Kim YH, Hong J. Nanoclay-Polyamine Composite Hydrogel for Topical Delivery of Nitric Oxide Gas via Innate Gelation Characteristics of Laponite. *Biomacromolecules*. 2020 Jun 8;21(6):2096-2103.

Peraro G, Donzelli E, Oliveira P, Tavares D, Martins CH, et al. Aminofunctionalized LAPONITE[®] as a versatile hybrid material for chlorhexidine digluconate incorporation: Cytotoxicity and antimicrobial activities. *Applied Clay Science*. 2020 Sep;01;195.

Pujala, Ravi Kumar. [Springer Theses] Dispersion Stability, Microstructure and Phase Transition of Anisotropic Nanodiscs. 2014. Doi:10.1007/978-3-319-04555-9

Ranjbaran H, Abediankenari S, Mohammadi M, Jafari N, Khalilian A, Rahmani Z, Momeninezhad Amiri M, Ebrahimi P. Wharton's Jelly Derived-Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Characterization. *Acta Med Iran*. 2018 Jan;56(1):28-33.

Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung HF, Evans BA, Thompson RP, et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone*. 2003 Feb;32(2):127-35.

Roobahani M, Kharaziha M, Emadi R. pH sensitive dexamethasone encapsulated laponite nanoplatelets: Release mechanism and cytotoxicity. *Int J Pharm*. 2017 Feb 25;518(1-2):312-319.

Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, Grigolo B. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Sep 1;78:1246-1262.

Shahar T, Rozovski U, Hess KR, Hossain A, Gumin J, Gao F, Fuller GN, Goodman L, Sulman EP, Lang FF. Percentage of mesenchymal stem cells in high-grade glioma tumor samples correlates with patient survival. *Neuro Oncol*. 2017 May 1;19(5):660-668.

Silva JM, Barud HS, Meneguim AB, Constantino VRL, Ribeiro SJL. Inorganic-organic bio-nanocomposite films based on Laponite and Cellulose Nanofibers (CNF). *Applied Clay Science*. 2019 Feb 1;428.

Silva JM. Nanocompósito de NFC/Laponite utilizado como suporte na produção de filmes luminescentes com o complexo Eu (III) - ligante 2-Thenoiltrifluoroacetona (TTA) [dissertação de mestrado]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2018

Sousa HR, Lima IS, Neris LML, Silva AS, Santos Nascimento AMS, Araújo FP, Ratke RF, Silva DA, Osajima JA, Bezerra LR, Silva-Filho EC. Superabsorbent Hydrogels Based to Polyacrylamide/Cashew Tree Gum for the Controlled Release of Water and Plant Nutrients. *Molecules*. 2021 May 3;26(9):2680.

Speit, G., Rothfuss, A. The Comet Assay: A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. In: Bjergbæk, L. (eds) DNA Repair Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 2012 July 23; 920.

Stewart MC, Stewart A. Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Sources, and Mechanisms of Action. *Veterinary Clinics of North America . Equine Practice*. 2011 27(2):243–61.

Tomás H, Alves CS, Rodrigues J. Laponite[®]: A key nanoplatform for biomedical applications? *Nanomedicine*. 2018 Oct;14(7):2407-2420.

Valencia GA, Djabourov M, Carn F, Sobral PJ do A. Novel insights on swelling and dehydration of laponite. *Colloid and Interface Science Communications*. 2018;23:1–5.

Wang JP, Ruan JL, Cai YL, Luo Q, Xu HX, Wu YX. In vitro and in vivo evaluation of the wound healing properties of Siegesbeckia pubescens. *J Ethnopharmacol*. 2011 Apr 12;134(3):1033-8.

Wang S, Castro R, An X, Song C, Luo Y, Shen M, et al. Electrospun laponite-doped poly(lactic-co-glycolic acid) nanofibers for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Materials Chemistry*. 2012 Oct;23;22(44):23357–67.

Zeynabad FB, Salehi R, Mahkam M. Design of pH-responsive antimicrobial nanocomposite as dual drug delivery system for tumor therapy. *Applied Clay Science*. 2017 Jun;141:23–35.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização química da Laponita[®] demonstrou uma estrutura cristalina e organizada do material. As análises termogravimétricas apresentaram a estabilidade do material frente às temperaturas o que o torna excelente para aplicações biomédicas e esterilização do material. A sua baixa toxicidade no teste de triagem com *Artemia salina*, evidencia que o material não causou toxicidade nas concentrações testadas. Os resultados do ensaio *in vitro* do teste de MTT sugere que a Laponita[®] proporciona um suporte para a proliferação celular, sem produzir citotoxicidade, destacando-se como um biomaterial promissor para a engenharia de tecidos devido a sua alta viabilidade celular. Além disso, a Laponita[®] foi capaz de induzir a osteogênese sem indução presente no meio e potencializou os resultados com indutor de diferenciação. No ensaio de genotoxicidade a Laponita[®] não apresentou diferenças significativas quando ao índice de dano, no entanto quanto a frequência do mesmo, os resultados expostos constataram que há uma tendência geral de aumento de dano em função das concentrações e em função do tempo. Assim, é importante destacar que o material apresenta resultados promissores, para uso em diversas áreas. Contudo, mais estudos serão necessários, para avaliar seu uso como biomaterial, além de investigar a atividade da ALP, dentre outros marcadores osteogênicos, durante a diferenciação celular, bem como, a utilização de outras metodologias que identifiquem potenciais genotóxicos a longo prazo, tornando a terapêutica com a Laponita[®] segura e eficaz.

4. REFERÊNCIAS

ADDITIVES, B.Y.K Instruments. 2008. Disponível em: <https://www.byk.com/fileadmin/byk/additives/product_groups/rheology/former_rockwood_additives/technical_brochures/BYK_BRI21_LAPONITE_EN.pdf>.

AGUZZI, C.; CERESO, P.; VISERAS, C.; CAMELLA, C. Use of clays as drug delivery systems: Possibilities and limitations, *Appl. Clay. Sci.*, v.36, n. 1-3, p. 22-36, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169131706001505>

BAGLIONI, S.; FRANCALANCI, M.; SQUECCO, R. et al. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 23, p. 3494–3505, 2009.

BHANG, S.H.; CHO, S.W.; LIM, J.M. et al. Locally delivered growth factors enhance the angiogenic efficacy of adipose-derived stromal cells transplanted to ischemic limbs. **Stem Cells**, v. 27, p. 1976-1986, 2009. PMID: 19544425. DOI: 10.1002/stem.115.

BAKSHI, A.; FISHER, O.; DAGCI, T.; HIMES, B. T.; FISCHER, I.; LOWMAN, A. Mechanically engineered hydrogel scaffolds for axonal growth and angiogenesis after transplantation in spinal cord injury. **Journal of Neurosurgery: Spine**, v. 1 n. 3, p. 322-329, 2004. <https://thejns.org/spine/view/journals/j-neurosurg-spine/1/3/article-p322.xml>

BARRY, F.P.; MURPHY J.M. Mesenchymal Stem Cells: Clinical Applications and Biological Characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 568-584, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.11.001>

BECHER, T. B. et al. The structure–property relationship in LAPONITE® materials: from Wigner glasses to strong self-healing hydrogels formed by non-covalent interactions. **Soft matter**, v. 15, n. 6, p. 1278-1289, 2019.

BECKER, A. J.; MCCULLOCH, E. A.; TILL, J. E. "Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells". **Nature**, v. 197 p. 452–454. 2 Fev. 1963. doi:10.1038/197452a0. hdl:1807/2779. PMID 13970094. S2CID 11106827

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS P. J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays, **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 4, p. 313-319, 10 Abr 2008. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.03.002>. PMID: 18397751; PMCID: PMC2613570.

BIPPUS, L.; JABER, M.; LEBEAU, B. Laponite and hybrid surfactant/laponite particles processed as spheres by spray-drying. **New Journal of Chemistry**, Cambridge, Inglaterra, v. 33, n. 5, p. 1116-1126, 2009.

BOIANI, M.; SCHÖLER, H.R. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 11, p. 72-84, 2005.

BOURIN, P.; BUNNELL, B. A.; CASTEILLA, L. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). **Cytotherapy**, v. 15, n. 6; p. 641–648, 2013.

BRAGA, A.S. **Estudo das Propriedades Ópticas e Elétricas dos Sistemas Laponita e Nanocompósitos de Laponita/Pontos Quânticos**. 116 p. Dissertação (Mestrado em física) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2019.

BROCK, C.R. Integrative Research: The Approach at the Harvard Stem Cell Institute. **South Med J**, v. 99, n. 12, p. 1446-1447, 2006. doi: 10.1097/01.smj.0000251397.53545.62.

BUK, M.V. **Estudo fotofísico da adsorção de moléculas orgânicas em argilas**. 78 p. Dissertação (Mestrado em ciências (Físico-química)) - Universidade Federal de São Paulo, São Carlos, 2018.

BURITI, B.M.A.B.; BURITI, J.S.; SILVA, A. et al. Characterization of clays from the State of Paraíba, Brazil for aesthetic and medicinal use. **Cerâmica**, v. 65, n. 373, p. 78-84, 2019.

BURT, R.K.; TRAYNOR, A.E. Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A New Therapy for Autoimmune Disease, **Stem Cells**, v. 17, n. 6, p. 366–372, 1999. <https://doi.org/10.1002/stem.170366>.

BYDLOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.M.F. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 31, p. 25-35, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-84842009005000038>>.

CAPLAN, A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **Journal of Pathology**, v.217, n. 2, p.318-324, 2009. doi: 10.1002/path.2469.

CARRETERO, M.I.; POZO, M. Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical industry: Part I. Excipients and medical applications. **Applied Clay Science**, v. 46, n. 1, p. 73-80, 2009.

CARRETERO, M. I.; POZO, M. Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical and cosmetic industries Part II. Active ingredients. **Applied Clay Science**, v. 47, n. 3- 4, p. 171-181, 2010.

CHAPARRO, T. C. **Synthesis of nanocomposites with anisotropic properties by controlled radical emulsion polymerization**. 240p. Tese (Doutorado em química)- Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2016.

CHIU, C.W.; HUANG, T.K.; WANG, Y.C. et al. Intercalation strategies in clay/polymer hybrids. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 3, p. 443-485, 2014.

CHRISTIDIS, George E. **Advances in the Characterization of Industrial Minerals**. 9. ed. London: Mineralogical Society of America, 2011. 495 p. v. 9. ISBN 0903056283.

CIDONIO, G.; COOKE, M.; GLINKA, M. et al. Printing bone in a gel: using nanocomposite bioink to print functionalised bone scaffolds. **Materials Today Bio**, v. 4, 2019.

COELHO, A.C.V.; SANTOS, P.S.; SANTOS, H.S. Argilas especiais: o que são, caracterização e propriedades. **Química Nova**, v. 30, p. 146-152, 2007.

COELHO, C.P.D. **Obtenção e caracterização de nanocompósitos de poliestireno e argilas esmectíticas**. 107 p. Dissertação (mestrado em engenharia). Escola politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CRANE, G.M.; ISHAUG, S.L.; MIKOS, A.G. Bone Tissue Engineering. **Nat. Med.**, v. 1, p. 1322–1324, 1995.

CRISAN, M. et al., A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. **Cell Stem Cell.**, v. 3, n. 3, p. 301-313, 2008. PMID: 18786417. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.003>

CUMMINS, H.Z. Liquid, glass, gel: The phases of colloidal laponite. *Journal of Non-Crystalline Solids*, **Elsevier**, v. 353, n. 41-43, p. 3891–3905, 2007.

DANIEL, L.M; FROST, R.L.; ZHU, H.Y. Synthesis and characterization of clay supported titania photocatalysts. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 316, n. 1, p. 72-79, 2007.

DAWSON, J.I.; KANCZLER, J.M.; YANG, X.B. et al. Clay Gels For the Delivery of Regenerative Microenvironments. **Advanced Materials**, v. 23, p. 3304–3308, 2011

DAWSON, J.I.; OREFFO, R.O.C. Clay: New Opportunities for Tissue Regeneration and Biomaterial Design. **Advanced Materials**, v. 25, n. 30, 2013. DOI: 10.1002/adma.201301034.

DIJKSTRA, M.; HANSEN, J.P.; MADDEN, P.A. Gelation of a clay colloid suspension. **Physical Review Letters**, v. 75, n. 11, p. 2236-2239, 1995.

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **Br. J. Haematol.**, v. 109, n. 1, p. 235-242, 2000. PMID: 10848804. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2000.01986.x.

ETO, H.; SUGA, H.; MATSUMOTO, D. et al. Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 124, p. 1087–1097, 2009.

FIORE, E. J.; MAZZOLINI, G.; AQUINO, J. B. Mesenchymal stem/stromal cells in liver fibrosis: Recent findings, old/new caveats and future perspectives. **Stem Cell Rev.**, v. 11, n. 4, p. 586–597, 2015.

FISHER, G.J.; KANG, S.; VARANI, J. et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Arch. Dermatol.**, v. 138, p. 1462–1470, 2002.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHYAN, R.K.; LATSINIK, N.V. et al. Stromal cells

responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation *in vivo*. **Transplantation.**, v. 17, n. 4, p. 331-340, 1974. DOI: 10.1097/00007890-197404000-00001. PMID: 4150881.

FRIEDENSTEIN, A.J; PIATETZKY-SHAPIRO, I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. /. *Embryol. exp. Morph.*, Vol. 16, 3, pp. 581-390, December 1966

FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASCH, G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. **Cell.** v. 116, n. 6, p. 769-778, 2004. DOI: 10.1016/s0092-8674(04)00255-7. PMID: 15035980.

GAHARWAR, A.K.; MIHAILA, S.M.; SWAMI, A. et al. Bioactive silicate nanoplatelets for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Adv Mater**, v. 25, n. 33, p. 29-36, 2013.

GHADIRI, M.; CHRZANOWSKI, W.; ROHANIZADEH, R. Biomedical applications of cationic clay minerals. **RSC Advances**, v. 5, n. 37, p. 29467–29481, 2015.

GOMBOS, E.D.; KRAKKÓ, D.; ZÁRAY, G. et al. Laponite immobilized TiO₂ catalysts for photocatalytic degradation of phenols. **Journal of Photochemistry & Photobiology A: Chemistry**, v. 387, 2020.

GOMES, C.F. Argilas: o que são e para que servem. **Fundação Calauste Gulbenkian**, 1988.

GONÇALVES, M.; FIGUEIRA, P.; MACIEL, D. et al. pH-sensitive Laponite(®)/doxorubicin/alginate nanohybrids with improved anticancer efficacy. **Acta Biomater.**, v. 10, n. 1, p. 300-307, 2014. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.09.013. PMID: 24075886.

GRIM, R.E **Clay mineralogy**, 2nd Ed., 596 p. McGraw Hill. New York, 1968.

GRITTI, A.; VESCOVI, A.L.; GALLI, R. Adult neural stem cells plasticity and developmental potential. **J. Physiol.**, v.96, n.1/2, p. 81-89, 2002.

GROUNDS MD, WHITE JD, ROSENTHAL N, BOGOYEVITCH MA. The Role of Stem Cells in Skeletal and Cardiac Muscle Repair. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 50, n. 5, p. 589-610, 2002. doi:10.1177/002215540205000501.

GUGGENHEIM, S.; MARTIN, R.T.; ALIETTI, A. et al. Definition of clay and clay mineral: joint report of the AIPEA and CMS Nomenclature Committees. *Clay Minerals*, v. 30, n. 3, p. 257-259, 1995.

HARAGUCHI, K. Synthesis and properties of soft nanocomposite materials with novel organic/inorganic network structures. **Polym J.**, v. 43, p. 223–241, 2011.

HONOLD, J.; ASSMUS, B.; LEHMAN, R. et al. Stem cell therapy of cardiac disease: an update. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 19, n. 7, p. 1673–1677, 2004 <https://doi.org/10.1093/ndt/gfh140>

HSU, Y.C.; FUCHS, E. A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 13, n. 2, p. 103-114, 2012. <https://doi.org/10.1038/nrm3272>

JAVAZON, E.H.; BEGGS, K.J. FLAKE, A.W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. **Exp Hematol.**, v. 32, n. 5, p. 414-425, 2004.

JUNGST, T.; SMOLAN, W.; SCHACHT, K. et al. Strategies and Molecular Design Criteria for 3D Printable Hydrogels. **Chem Rev.**, v. 116, n. 3, p. 1496-1539, 2016.

KAWSUWAN, S.; SONG, S.Y.; KIM, J.H. et al. Mimicking the functional niche of adipose-derived stem cells for regenerative medicine. **Expert Opin Biol Ther**, v. 12, p. 1575-1588, 2012, PMID: 22953993. DOI: 10.1517/14712598.2012.721763.

KAHN, C.R. Medicine. Can we nip obesity in its vascular bud? **Science**, v. 322, p. 542–543, 2008.

KATO, H.; SUGA, H.; ETO, H. et al. Reversible adipose tissue enlargement induced by external tissue suspension: possible contribution of basic fibroblast growth factor in the preservation of enlarged tissue. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, p. 2029–2040, 2010.

KAUSAR, A.; IQBAL, M.; JAVED, A, et al. Dyes adsorption using clay and modified clay: A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 256, p. 395–407, 2018.

KHATOON, N.; CHU, M.Q.; ZHOU, C.H. Nanoclay-based drug delivery systems and their therapeutic potentials. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 8, n. 33, p. 7335-7351, 2020.

KILROY, G.E.; FOSTER, S.J.; WU, X. et al. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. **J Cell Physiol.**, v. 212, n. 3, p. 702-709, 2007. DOI: 10.1002/jcp.21068. PMID: 17477371.

KIM, Y.H.; YANG, X.; SHI, L. et al. Bisphosphonate nanoclay edge-site interactions facilitate hydrogel self-assembly and sustained growth factor localization. **Nature communications**, v. 11, n. 1, 2020.

KIRBY, G.T.; MILLS, S.J.; COWIN, A.J. et al., Stem cells for cutaneous wound healing. **BioMed Res. Int.**, New York, v. 2015, 2015, DOI: 10.1155/2015/285869.

KUMAR, N.V.N.; MURALIDHAR, K.; JOSHI, Y.M. On the refractive index of ageing dispersions of laponite. **Applied Clay Science**, Amsterdã, Países Baixos, v. 42, n. 1-2, p. 326-330, 2008.

LABANDA, J.; SABATÉ, J.; LLORENS, J. Rheology changes of laponite aqueous dispersions due to the addition of sodium polyacrylates of different molecular weights. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 301, n. 1-3, p. 8–15, 2007.

LAPASIN, R.; GRASSI, M.; ABRAMI, M. et al. Structural evolution of salt-free aqueous

Laponite dispersions: a study based on Low-Field NMR relaxometry and rheological investigations, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 605, 2020.

LEE, E.Y.; XIA, Y.; KIM, W.S. et al. Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. **Wound Repair Regen**, v. 17, p. 540-547, 2009.

LI, T.; LIU, Z.L.; XIAO, M. et al. Impact of bone marrow mesenchymal stem cell immunomodulation on the osteogenic effects of laponite. **Stem Cell Res Ther**, v. 9, n. 100, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0818-0>

LIN, G.; GARCIA, M.; NING, H. et al. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. **Stem Cells Dev.**, v. 6, p. 1053-1063, 2008. doi: 10.1089/scd.2008.0117. PMID: 18597617; PMCID: PMC2865901.

LIMA, K.S. **Estudo de nanocompósitos poli (metacrilato de hidroxietila)/ laponita para revestimento de sementes**. 83p. Dissertação (Mestrado em química)- Universidade Federal de Sergipe, 2018.

LJUNGMAN, P.; BREGNI, M.; BRUNE, M. et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. **Bone Marrow Transplant.**, London, v. 45, n. 2, p. 219-234, 2010.

LÓPEZ-GALINDO, A.; VISERAS, C.; CERESO, P. Compositional, technical and safety specifications of clays to be used as pharmaceutical and cosmetic products. **Applied Clay Science**, v. 36, n. 1-3, p. 51-63, 2007.

LU, S.; WANG, J.; YE, J. et al. Bone Morphogenetic Protein 9 (BMP9) Induces Effective Bone Formation from Reversibly Immortalized Multipotent Adipose-Derived (iMAD) Mesenchymal Stem Cells. **Am. J. Transl. Res.**, v. 8, p. 3710–3730, 2016.

LUO, Y.; SHOICHET, M.S. A photolabile hydrogel for guided three-dimensional cell growth and migration. **Nat. Mater.**, v. 3, n. 249, 2004.

MACHADO, M.C.P.; LANGBEHN, J.T.; OLIVEIRA, C.M. et al. Estudo do comportamento e caracterização de argilas bentoníticas após processo de liofilização. **Cerâmica**, v. 64, n. 370, p. 207-213, 2018

MASSARO, M.; COLLETTI, C.G.; LAZZARA, G. et al. The use of some clay minerals a natural resources for drug carrier applications. **Journal of functional biomaterials**, v. 9, n. 4, p. 58, 2018

MCCULLOCH, E.A.; TILL, J.E. "The Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells, Determined by Quantitative Marrow Transplantation into Irradiated Mice". **Radiation Research.**, v. 13, n. 1, p. 115, 1960. doi:10.2307/3570877. hdl:1807/2782. JSTOR 3570877

MEIRELLES, L.S.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in

virtually all post-natal organs and tissues. **J Cell Sci.**, v. 119, n. 1, p. 2204-2213, 2006. doi: 10.1242/jcs.02932. Epub 2006 May 9. PMID: 16684817.

MICHELS, L.; FONSECA, C.L.S.; MÉHEUST, Y. et al. The Impact of Thermal History on Water Adsorption in a Synthetic Nanolayered Silicate with Intercalated Li⁺ or Na⁺. **J. Phys. Chem. C**, v. 124, n. 45, p. 24690–24703, 2020.

MIHAILA, S.M.; FRIAS, A.M.; PIRRACO, R.P. et al. Human adipose tissue-derived SSEA-4 subpopulation multi-differentiation potential towards the endothelial and osteogenic lineages. **Tissue Eng Part A**, v. 19, p. 235–246, 2013.

MIHAILA, S.M.; GAHARWAR, A.K.; REIS, R.L. et al. The osteogenic differentiation of SSEA-4 sub-population of human adipose derived stem cells using silicate nanoplatelets. **Biomaterials**, v. 35, p. 9087–9099, 2014.

MITALIPOV, S.; WOLF, D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 114, p. 185-99, 2009.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Clínica**: Tradução de "The developing human : clinically oriented embryology.". 8. ed. [S. l.]: Elsevier Editora Ltda, 2008. 560 p. ISBN 978-85-352-2662-1.

MORAES, J.D.D. et al. Clay minerals: Properties and applications to dermocosmetic products and perspectives of natural raw materials for therapeutic purposes—A review. **International journal of pharmaceutics**, v. 534, n. 1-2, p. 213-219, 2017.

MORRISON, S.J. et al. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance through life. **Cell**, Cambridge, v. 132, n. 4, p. 598-611, 2008.

MOUSA, M. et al. Clay nanoparticles for regenerative medicine and biomaterial design: a review of clay bioactivity. **Biomaterials**, v. 159, p. 204-214, 2018.

MUTHUKRISHNAN, L.; WARDER, E.; MCNEIL, P.L. Basic fibroblast growth factor is efficiently released from a cytosolic storage site through plasma membrane disruptions of endothelial cells. **J Cell Physiol**, v. 148, p. 1-16, 1991. [PMID: 1860889 DOI: 10.1002/jcp.1041480102]

NEUMANN, M. G.; GESSNER, F.; CIONE, A. P. P.; SARTORI, R. A.; CAVALHEIRO, C. C. S. Interações entre corantes e argilas em suspensão aquosa. **Química Nova**, v.23, p. 818-824, 2000.

NICOLAI, T.; COCARD, S. Structure of gels and aggregates of disk-like colloids. **European Physical Journal E**, v.5, n.2, p. 221-227, 2001.

NISHIKAWA, S.; JAKT, L.; ERA, T. Embryonic stem-cell culture as a tool for developmental cell biology. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 8, p. 502–507, 2007. <https://doi.org/10.1038/nrm2189>

NOMBELA-ARRIETA, C., RITZ, J. & SILBERSTEIN, L. The elusive nature and function of

mesenchymal stem cells. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 12, p. 126–131, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrm3049>

ODORICO, J.S.; KAUFMAN, D.S., THOMSON, J.A., Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines, **Stem Cells**, v. 19, n. 3, 2001, p. 193–204, <https://doi.org/10.1634/stemcells.19-3-193>

O'FARRELL PH, STUMPFF J, SU TT. Embryonic cleavage cycles: how is a mouse like a fly? **Curr Biol.**, v. 1, p. 35-45, 2004.

OGURA, F.; WAKAO, S.; KURODA, Y. et al. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. **Stem Cells and Development**, v. 23, p. 717–728, 2014.

PAGE, D.J.; CLARKIN, C.E.; MANI, R. et al. Injectable nanoclay gels for angiogenesis. **Acta Biomaterialia**, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.09.023>

PARK, J.K.; CHOY, Y.B.; OH, J.M. et al. Controlled release of donepezil intercalated in smectite clays. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 359, n. 1-2, p. 198-204, 2008.

PARK, K.; OREFFO, R.; DAWSON, J.I. et al. Nanoclay-polyamine composite hydrogel for topical delivery of nitric oxide gas via innate gelation characteristics of laponite. **Biomacromolecule**, 2020. DOI: 10.1021/acs.biomac.0c00086.

PAVLIDOU, S.; PAPAPYRIDES, C.D. A review on polymer-layered silicate nanocomposites, *prog polym sci* 2008; 33:1119-98

PERARO, G.R.; DONZELLI, E.H.; OLIVEIRA, P.F. et al. Aminofunctionalized LAPONITE® as a versatile hybrid material for chlorhexidine digluconate incorporation: Cytotoxicity and antimicrobial activities. **Applied Clay Science**, v. 195, 2020.

PHINNEY, D. G. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 85, p. 7-12, 2002. <https://doi.org/10.1002/jcb.10084>

PIGNON, F.; MAGNIN, A.; PIAU, J-M. et al. A yield stress thixotropic clay suspension: investigations of structure by light, neutron and x-ray scatterin. **Physical Review**, v. 56, p. 3281-3289, 1997.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p. 143-147, 1999. doi: 10.1126/science.284.5411.143.

PLANAT-BENARD, V.; SILVESTRE, J.S.; COUSIN, B. et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. **Circulation**, v. 109, p. 656– 663, 2004.

POHL, H.R.; WHEELER, J.S.; MURRAY, H.E. Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases. **Met Ions Life Sci**, v. 13, p. 573, 2013.

PU, W.; HAN, Y.; YANG, M. Human decellularized adipose tissue hydrogels as a culture platform for human adipose-derived stem cell delivery. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**, v. 19, 2021. doi:10.1177/2280800020988141

RAFF, M. Adult stem cell plasticity: Fact or Artifact? Annual Review of Cell and Developmental Biology, **Palo Alto**, v. 19, n. 1, p. 1-22, 2003.

RAND, B.; PEKENC, E.; GOODWIN, J.W. et al. Investigation into the existence of edge-face coagulated structures in Na-Montmorillonite suspensions. **Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions I**, v.76, p. 225-235, 1980.

REFFITT, D.M.; OGSTON, N.; JUGDAOHSINGH, R. et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells *in vitro*. **Bone**, v. 32, p. 127–135, 2003.

REHMAN, J.; TRAKTUEV, D.; LI, J. et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. **Circulation**, v. 109, n. 10, p. 1292–1298, 2004.

ROMANI, A.M.P. Cellular magnesium homeostasis. **Arch Biochem Biophys**, v. 512, p. 1–23, 2011.

RUZICKA, B.; ZACCARELLI, E. A fresh look at the laponite phase diagram. **Soft Matter, Royal Society of Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 1268–1286, 2011.

SALGADO, A.J.; REIS, R.L.; SOUSA, N.J. et al. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. **Curr Stem Cell Res Ther.**, v. 5, p. 103-110, 2010. [PMID: 19941460 DOI: 10.2174/157488810791268564].

SANTOS, P.S. **Estudo tecnológico de argilas montmoriloníticas do Distrito de Boa Vista, Campina Grande, Paraíba**- Tese para concurso à cátedra de Química Industrial, Depto. De Engenharia Química EPUSP, São Paulo, (Publicação IPT nº 862, São Paulo), 1976.

ŠEBENIKA, U.; LAPASIN, R.; KRAJNCA, M. Rheology of aqueous dispersions of Laponite and TEMPO-oxidized nanofibrillated cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 240, 2020.

SHAH, F.S.; LI, J.; DIETRICH, M. et al. Comparison of stromal/stem cells isolated from human omental and subcutaneous adipose depots: differentiation and Immunophenotypic characterization. **Cells, Tissues, Organs**, v. 200, p. 204–211, 2014.

SHAW, D. J. **Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies**. [S.l.]: Edgard Blücher, São Paulo, 1975, 97p.

SHI, P.; KIM, Y. H.; MOUSA, M.; SANCHEZ, R. R.; OREFFO, R. O. C.; DAWSON J. I. Self-Assembling Nanoclay Diffusion Gels for Bioactive Osteogenic Microenvironments. **Adv. Healthcare Mater.** 2018, 1800331.

SHORT, B.; BROUARD, N.; OCCHIODORO-SCOTT, T. et al. Mesenchymal stem cells. **Archives of Medical Research**, v. 34, n. 6, 2003, p. 565-571, 0188-4409. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2003.09.007>.

SILVA, A.L.; LUNA, C.B.B.; CHAVES, A.C. et al. Avaliação de novos depósitos de argilas provenientes da região sul do Amapá visando aplicação na indústria cerâmica. **Cerâmica**, v. 64, n. 369, p. 69-78, 2018.

SILVA, A.N.C.; MORAIS, V.; NETO, J.P.C. et al. Prospecção Tecnológica de compósito atapulgita-goma do chicha como carreador de fármacos. **CADERNOS DE PROSPECÇÃO**, v. 10, n. 1, p. 37- 46, 2017.

SILVA, A.R.V.; FERREIRA, H.C. Esmectitas organofílicas: conceitos, estruturas, propriedades, síntese, usos industriais e produtores/fornecedores nacionais e internacionais. **Revista eletrônica de Materiais e Processos**, v. 3, n. 3, p. 01–11, 2008.

SMITH, A.G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, v. 17, p. 435-462, 2001. doi: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.435. PMID: 11687496.

SPALDING, K.L.; ARNER, E.; WESTERMARK, P.O. et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. **Nature**, v. 453, 783–787, 2008.

SONG, S. Y.; CHUNG, H.M.; SUNG, J.H. The pivotal role of VEGF in adipose-derived-stem-cell-mediated regeneration. **Expert Opin Biol Ther**, v. 10, p. 1529-1537, 2010. [PMID: 20860536 DOI: 10.1517/14712598.2010.522987

SUGA, H.; ETO, H.; SHIGEURA, T. et al. IFATS collection: Fibroblast growth factor-2-induced hepatocyte growth factor secretion by adipose-derived stromal cells inhibits postinjury fibrogenesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. **Stem cells**, v. 27, p. 238–249, 2009.

SUN, Z.; GOU, W.; KIM, D-S. et al. Adipose Stem Cell Therapy Mitigates Chronic Pancreatitis via Differentiation into Acinar-like Cells in Mice. **Molecular Therapy**, v. 25, n. 11, 2017.

SWAMINATHAN, R. Magnesium metabolism and its disorders. **Clin Biochem Rev.**, v. 24, n. 2, p. 47–66, 2003.

SZPALSKI, C.; WETTERAU, M.; BARR, J. et al. Bone Tissue Engineering: Current Strategies and Techniques Part I: Scaffolds. **Tissue Eng., Part B**, v. 18, p. 246–257, 2012.

TAWARI, S.L.; KOCH, D.L.; COHEN, C. Electrical double-layer effects on the brownian diffusivity and aggregation rate of laponite clay particles. **Journal of Colloid and Interface Science, Elsevier**, v. 240, n. 1, p. 54–66, 2001.

THOMSON, J.A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S.S. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, Washington, v. 282, n.5391, p. 1145-1147, 1998.

TILL, J.E., & MC, C.E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Radiat Res**, v. 14, p. 213–222, 1961.

TOMÁS, H.; ALVES, C.S., RODRIGUES J. Laponite®: A key nanoplatform for biomedical applications? **Nanomedicine**, v. 14, n. 7, p. 2407-2420, 2018. doi: 10.1016/j.nano.2017.04.016. Epub 2017 May 26. PMID: 28552649.

UNGER, R.H.; SCHERER, P.E.; HOLLAND, W.L. Dichotomous roles of leptin and adiponectin as enforcers against lipotoxicity during feast and famine. **Molecular Biology of the Cell**, v. 24, p. 3011–3015, 2013.

VALENCIA, G.A.; MORAES, I.C.F.; HILLIOU, L.H.G. et al. Nanocomposite-forming solutions based on cassava starch and laponite: viscoelastic and rheological characterization. **Journal of Food Engineering**, v. 166, p. 174-181, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.06.006>.

VISERAS, C.; CARAZO, E.; BORREGO-SÁNCHEZ, A. et al. Clay minerals in skin drug delivery. **Clays and Clay Minerals**, v. 67, n. 1, p. 59-71, 2019.

VISERAS, C.; CERESO, P.; SANCHEZ, R. et al. Current challenges in Clay minerals for drug delivery. **Appl Clay Sci**, v. 48, p. 291–295, 2010.

WAGERS, A.M.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of adult stem cells. **Cell Press**, Cambridge, v. 116, n.5, p. 639-648, 2004.

WANG, S.; WU, Y.; GUO, R. et al. Laponite nanodisks as an efficient platform for Doxorubicin delivery to cancer cells. **Langmuir**, v. 29, n. 16, p. 5030-5036, 2013. doi: 10.1021/la4001363. Epub 2013 Feb 26. PMID: 23419072.

WANG, S.G.; CASTRO, R.; NA, X. et al. Electrospun laponite-doped poly(lactic-co-glycolic acid) nanofibers for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **J Mater Chem**, v. 22, p. 23357–23367, 2012.

WANG, Y.; CHEN, X.; CAO, W. et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. **Nat Immunol.**, v. 11, p. 1009-1016, 2014. DOI: 10.1038/ni.3002. PMID: 25329189.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol Ver**, v. 83, p. 835-870, 2003. [PMID: 12843410 DOI: 10.1152/physrev.00031.2002].

WILLIAMS, R.; RYVES, W.J.; DALTON, E.C. et al. A molecular cell biology of lithium. **Biochem Soc Trans**, v. 32, p. 799–802, 2004.

YANG, J-H.; LEE, J-H.; RYU, H-J. et al. Drug–clay nanohybrids as sustained delivery systems. **Applied Clay Science**, v. 130, p. 20-32, 2016.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006.

ZHANG, R.; XIE, L.; WU, H. et al. Alginate/laponite hydrogel microspheres co-encapsulating dental pulp stem cells and VEGF for endodontic regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 113, n. 1, p. 305-316, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.07.012>

ZHANG, Y.; FAN, W.; WANG, K. et al. Novel preparation of Au nanoparticles loaded Laponite nanoparticles/ECM injectable hydrogel on cardiac differentiation of resident cardiac stem cells to cardiomyocytes. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 192, p. 49-54, 2018.

ZHU, W.; MA, X.; GOU, M. et al. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. **Curr Opin Biotechnol.**, v. 40, p. 103–112, 2016.

ZIPORI, D. The nature of stem cells: state rather than entity. **Nat Rev Genet.**, v. 5, n. 11, p. 873-878, 2004. doi: 10.1038/nrg1475. PMID: 15520797.

ZOU, Y.; QAZVINI, N.T.; ZANE, K. et al. Gelatin-derived graphene–silicate hybrid materials are biocompatible and synergistically promote BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 9, p. 15922–15932, 2017

ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol Biol Cell**, v. 13, p. 4279-4295, 2002 [PMID: 12475952 DOI: 10.1091/ mbc.E02-02-0105].