

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – UFTM
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

TATIANA LAMOUNIER SILVA

**ANÁLISE DA CITOTOXIDADE E IMUNOMODULAÇÃO DE
BIOVIDRO PURO E NANOESTRUTURADOS COM TiO₂**

Uberaba-MG

2024

TATIANA LAMOUNIER SILVA

**ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE E IMUNOMODULAÇÃO DE
BIOVIDRO PURO E NANOESTRUTURADOS COM TiO₂**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em **CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**, área de concentração “**I - BIOQUÍMICA, FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**” (Linha de Pesquisa: **BIOSENSORES E MATERIAIS NANOESTRUTURADOS APLICADOS EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Uberaba-MG

2024

Ficha Catalográfica

TATIANA LAMOUNIER SILVA

ANÁLISE DA CITOTOXIDADE E IMUNOMODULAÇÃO DE BIOVIDRO PURO E NANOESTRUTURADOS COM TiO₂

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em **CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**, área de concentração **"I - BIOQUÍMICA, FIOLOGIA E FARMACOLOGIA "** (Linha de Pesquisa: **BIOSENSORES E MATERIAIS NANOESTRUTURADOS APLICADOS EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Uberaba, 30 de agosto de 2024

Banca Examinadora:

Dr. RODRIGO CÉSAR ROSA - Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. ANDERSON ASSUNÇÃO ANDRADE
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. GEORGE KEMIL ABDALLA
Inapós - Faculdade de Medicina e Odontologia



Documento assinado eletronicamente por **ANDERSON ASSUNCAO ANDRADE, Professor do Magistério Superior**, em 03/09/2024, às 13:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024](#).



Documento assinado eletronicamente por **RODRIGO CESAR ROSA, Professor do Magistério Superior**, em 01/10/2024, às 10:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1326017** e o código CRC **996DA758**.

AGRADECIMENTOS

A princípio manifesto minha gratidão a Deus, pelo privilégio de vivenciar esse momento tão inigualável.

Ao meu estimado professor e orientador Rodrigo Cesar Rosa, que me instigou buscar sempre edificar a melhor versão de mim, do início ao fim, durante todo esse processo de formação acadêmica, mediante constante estímulo e ensinamentos. Realmente demonstrando no dia a dia o que é ser uma pessoa dotada de excepcional saber, competência, talento em qualquer ciência ou arte, enfim um verdadeiro mestre.

Meus colegas integrantes do Laboratório de Reabilitação Morfofuncional – LAREM. Pela contínua ajuda e compreensão das inúmeras limitações e dificuldades enfrentadas. Em especial, os colegas Paulo César Pio e Odival Seabra.

Aos professores Marcos Vinicius da Silva, Carlo José Freire de Oliveira e Virmondes Rodrigues Júnior e a sua equipe integrante do Laboratório de Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Em especial, os colegas Hugo Felix Perini, Malu Mateus Santos Obata, Rafael Obata, Thais Farnesi e Beatriz Sodré Matos.

Aos meus colegas de pós-graduação, Adriano Jander Ferreira, Luiz Antonio Pertili, Mariana Sampaio Paquete, Wanessa Maria dos Santos, Thaís Vilela de Almeida Silva, Sthefânia Dalva da Cunha Rezende e a todos com quem convivi intensamente durante os últimos anos. Agradeço a todos pelo companheirismo e pela troca de experiências, que me permitiram crescer não só como profissional, mas também como pessoa.

À minha amiga Camilla Beatriz da Silva Melo pelo companheirismo e cumplicidade, por compartilha seu conhecimento e por todo apoio neste período tão

intenso da minha vida. Você foi mais um dos presente que tive oportunidade de conquistar neste período do mestrado. Espero que você esteja sempre presente em minha vida!

Á coordenação e secretária do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas. Em especial, Elisabete, pelo contínuo apoio e amizade.

Aos profissionais do Laboratório de Anatomia, em especial o técnico Marcelo do Carmo. A todos os professores que participaram da minha trajetória e contribuíram com a minha formação, seja direta ou indiretamente. Em especial, Renata Alves, Renata Etchebehere, Odonório Abrahão, Aline Dias Paiva e Anderson Assunção Andrade, os quais tive o privilégio de conviver e adquirir novos conhecimentos. Grata por todo auxílio e paciência!

Não posso deixar de agradecer ao apoio de todos gestores, em especial da minha chefia imediata no Hospital de Clínicas da UFTM. Neste período, recebi apoio de vários colegas, em especial agradeço: Renata Lobianco, Regiane Isidoro, Ana Claudia Faquini, Cintia Dutra, Tassiana Moreira, Andreia Malher, Diego Andrade, Lucas Carvalho Santana, Daniela Cristina Silva Salgado, Dylmadson Iago Queiroz e a Dona Dirce Maria Lazára. Todas as inúmeras dificuldades, "pedras no caminho", foram o combustível que eu precisava para perseverar!

Á todos os seres humanos incríveis que fizeram parte neste período da minha vida! Em especial, a minha eterna amiga: Alessandra Azevedo.

Por último, mas imprescindível agradecer aos meus pais (Samaritana e Adelson - *in memória*) e meus amados filhos João Vittor e Bárbara, que sempre me incentivaram e demonstram ser compreensivos nos momentos de ausência. Principalmente, neste período...

Desculpe me pela ausência!

DEDICATÓRIA

Dedico à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, meus Pais (Samaritana e Adelson) e meu Filhos (João Vittor e Bárbara).

RESUMO

A incorporação de nanocristais na estrutura molecular de biovidros é inovador, o que possibilita a intensificação de diversas propriedades físicas, químicas e biológicas. Essas propriedades precisam ser melhor caracterizadas nas diversas aplicações clínicas. Logo, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um novo método de síntese, com a incorporação nanocristais de Dióxido de Titânio (TiO_2) na estrutura molecular de biovidros, no sistema vítreo SNCP ($\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$). O estudo foi delineado com a finalidade de iniciar o processo de análise do potencial de aplicação clínica desses novos biocompostos. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar a citotoxicidade e imunomodulação de novos biovidros nanoestruturados com TiO_2 , por meio da viabilidade em células sanguíneas humanas (PBMC), dosagem de citocinas e ensaio de sobrevivência em larvas de *Galleria mellonella*. Os resultados indicam que os tratamentos com biovidro puro e nanoestruturado levam ao aumento da secreção de $\text{IFN-}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 pelas células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), enquanto a secreção de $\text{TNF-}\alpha$ é reduzida. Ensaio de citotoxicidade revelaram que o biovidro puro e o biovidro nanoestruturado contendo 10% de titânio (Ti) exibiram menor citotoxicidade em comparação com formulações contendo 20% e 30% de Ti em PBMCs. No entanto, experiências in vivo utilizando o modelo de larvas de *Galleria mellonella* demonstraram ausência de toxicidade mesmo em concentrações mais elevadas (100 $\mu\text{g/larvas}$). Essas descobertas sugerem que a incorporação de TiO_2 no biovidro SNCP pode melhorar suas propriedades biológicas.

Palavras-chave: Biovidro nanoestruturado Citotoxicidade, nanotecnologia, *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

The incorporation of nanocrystals into the molecular structure of bioglasses is innovative, which allows the intensification of various physical, chemical and biological properties. These properties need to be better characterized in various clinical applications. Therefore, our research group developed a new synthesis method, with the incorporation of Titanium Dioxide (TiO₂) nanocrystals into the molecular structure of bioglasses, in the SNCP glass system (SiO₂-Na₂O-CaO-P₂O₅). The study was designed with the aim of starting the process of analyzing the potential clinical application of these new biocompounds. Therefore, the objective of the study was to evaluate the cytotoxicity and immunomodulation of new nanostructured bioglasses with TiO₂, through viability in human blood cells (PBMC), cytokine measurement and survival assay in *Galleria mellonella* larvae. The results indicate that pure and nanostructured bioglass treatments lead to increased secretion of IFN- γ , IL-1 β , and IL-6 by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), while TNF- α secretion is reduced. Cytotoxicity assays revealed that pure bioglass and nanostructured bioglass containing 10% titanium (Ti) exhibited lower cytotoxicity compared to formulations containing 20%, and 30% Ti in PBMCs. However, in vivo experiments using the *Galleria mellonella* larvae model demonstrated no toxicity even at higher concentrations (100 μ g/larvae). These findings suggest that incorporating TiO₂ into SNCP bioglass can improve its biological properties.

Key words: Nanostructured bioglass Cytotoxicity, nanotechnology, *Galleria mellonella*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do ensaio in vitro de biocompatibilidade em células humanas do sangue periférico	18
Figura 2: Representação esquemática do teste de viabilidade – Ensaio de redução do MTT.....	19
Figura 3: Representação esquemática do processo de quantificação de citocinas .	20
Figura 4: Representação esquemática do ensaio de sobrevivência em larvas de Galleria.....	21
Figure 4: Cytokine production of human peripheral blood cells (PBMCs) after treatment with 100, 50 and 25 µg/mL of pure bioglass (Ti 0%) and nanostructured with TiO ₂ (Ti 10%, Ti 20% and Ti 30%) for 24h. IFN-γ (A), IL-1β (B), IL-6 (C), IL-10 (D) and TNF-α (E). Equal letters indicate no statistical differences (p<0.05).....	31
Figure 5: Percentage of cytotoxicity of pure bioglass (Ti 0%) and nanostructured with TiO ₂ (Ti 10%, Ti 20% and Ti 30%) against human peripheral blood cells (PBMCs) by MTT reduction method. *p<0.05.....	32
Figure 6: Keplan-Meier survival curve of Galleria mellonella larvae inoculated with 100 µg of pure bioglass (Ti 0%) and bioglass nanostructured with TiO _T (Ti 10%, Ti 20% and Ti 30%). Ns indicates non-significant differences (p<0.05).	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Grau Celsius

µg – Micrograma

µL - Microlitro

CO₂- dióxido de carbono

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid

IFN-γ - Interferon gamma

IL-1β - Interleukin-1 beta

IL-10- Interleukin 10

IL-4 – Interleukin 4

IL-6 – Interleukin 6

M1 – Macrófago do tipo 1

M2 – Macrófago do tipo 2

M-CSF = Fator estimulante de colônias de macrófagos

mL – Mililitro

MTT- Teste viabilidade celular

NaCl – Cloreto de Sódio

NCs – Nanocristais

NIT- Núcleo de Inovação Tecnologia

nm – Nanômetro

NPs – Nanopartículas

PBMCs - Células mononucleares do sangue periférico

RANKL = Receptor ativador do fator nuclear kappa-b

RPM – Rotação por minuto

SNCP- Sistema vítreo

TGF-β =Fator de crescimento transformador beta

TiO₂ - Dióxido de titânio

TNF-α - Fator de necrose tumoral

TNF-α = Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	JUSTIFICATIVA.....	15
3	HIPÓTESE.....	16
4	OBJETIVOS	17
4.1	OBJETIVO GERAL	17
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
5	MATERIAS E METODOS	18
5.1	Ensaio in vitro de biocompatibilidade em células humanas do sangue periférico ...	18
5.2	Quantificação de Citocinas	19
5.3	Ensaio de Sobrevivência em Larvas de Galleria mellonella.....	20
5.4	Análise Estatística	21
	REFERÊNCIAS	22
6	APÊNDICE A - ARTIGO SUBMETIDO.....	26
7	APÊNDICE B - LISTA PARTICIPAÇÃO DE COAUTORES	39
8	ANEXO B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	40

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, houve enormes avanços na área de engenharia de materiais, em especial relacionados à saúde humana. Entretanto, antes de ser implantado no organismo, um biomaterial deve atender a vários pré-requisitos de biocompatibilidade, ou seja, deve apresentar ação terapêutica, sem causar efeitos locais ou sistêmicos indesejados (Marin et al., 2020). Logo, espera-se que ocorra uma resposta celular ou tecidual mais benéfica possível, em vista a otimizar a atividade terapêutica (Costa et al., 2023).

O desenvolvimento de biomateriais é um processo complexo por envolver ampla probabilidades de aplicações na área de saúde, seja na engenharia de tecidos e/ou medicina regenerativa (Xue et al., 2022). Principalmente, nas lesões com grande perda da integridade, em que é notada limitada capacidade de reparação, em decorrência da destruição da matriz extracelular (Kopec, 2022).

Nesse contexto, há uma crescente demanda de substitutos ósseos, em decorrência do aumento da incidência cada vez maior de traumas, defeitos congênitos e doenças degenerativas (Xie et al., 2020), mas até o momento não há um biomaterial ideal, que substitua adequadamente o tecido ósseo.

Contudo, muitos estudos osteogênicos clássicos têm concentrado seus esforços no desenvolvimento de biomateriais para o preenchimento do defeito ósseo, atendo-se apenas aos princípios químicos, físicos e mecânicos. No entanto, essa abordagem ignora o fato de que o reparo do defeito ósseo é um processo fisiológico dinâmico, que envolve um intenso processo imunoinflamatório, com a participação de uma ampla variedade de células e citocinas pró e anti-inflamatórias (Nascimento, 2022; Pajarinen et al., 2019).

1.1 Substitutos Ósseos

Inúmeros substitutos ósseos veem sendo desenvolvimentos, mas até o momento não há um biomaterial ideal, que cumpra adequadamente todos os requisitos. Nas últimas décadas, houve considerável aumento no desenvolvimento de novos biomateriais e de estudos delineados com objetivo de determinar o potencial clínico desses novos biocompostos. Em destaque, aqueles com potencial

de aplicação clínica no processo de cicatrização óssea (Limmer & Wirtz, 2017; Minardi et al., 2016; Xie et al., 2020, Xue et al., 2022).

Nesse sentido, um substituto ósseo ideal deve não apenas preencher o defeito ósseo, mas atuar efetivamente no processo de regeneração óssea, em que deve haver gradual bioabsorção, com presença de neoformação e completa reparação da lesão (Ambrosio et al., 2021; Suwardi et al., 2022).

O biomaterial ideal deve promover uma resposta celular ou tecidual mais benéfica possível, em vista a otimizar a atividade terapêutica (Marin et al., 2020). Logo, espera-se que após a sua implantação, ocorra uma interação entre o sistema imunológico e o biomaterial implantado, resultando em uma resposta celular inespecífica ao biomaterial SNCP TiO₂ (Limmer & Wirtz, 2017).

De maneira que, ainda não existe um material que atenda a todos os requisitos desejados, apesar do grande número de materiais orgânicos e sintéticos capazes de substituir o tecido ósseo ou estimular a osteogênese reparadora (Marin et al., 2020; Szczesny et al., 2022).

1.2 Nanobiomateriais

Na atualidade, novos materiais em escala nanométrica têm sido desenvolvidos em vista a aplicação na área médico-odontológica. Desse modo, há relatos em que esses biomateriais têm a capacidade de substituir com precisão a composição e a arquitetura do osso, permitindo a recapitulação de características cruciais de seu meio bioquímico (Minardi et al., 2016).

Os biomateriais apresentam capacidade aprimorada de modulação de células do sistema imunológico (Cheng et al., 2023). Assim, apesar de haver escassos relatos na literatura, essas novas nanotecnologias tem demonstrado resultados promissores, em vista ao processo de reparação óssea (Kim et al., 2020; Minardi et al., 2016; Xie et al., 2020; Xue et al., 2022).

1.3 Osteoimunologia

A osteoimunologia se dedica a entender a interação entre o sistema imunológico e o tecido ósseo. Há inúmeras relatos de proteínas funcionais,

moléculas de sinalização e citocinas com atuação de forma síncrona em eventos e vias de sinalização imune, que estão intimamente relacionadas com a formação óssea (Arron & Choi, 2000; Kim et al., 2020).

Nessa perspectiva, a imunomodulação induzida por biomateriais pode repercutir no processo de crescimento e maturação do tecido óssea, durante a fase de reparo e remodelação (Lorenzo et al., 2008; Takayanagi, 2005).

As maiores contribuições relacionam-se aos avanços e descobertas dos mecanismos de modulação de resposta imunoinflamatória, em especial aquelas atribuídas a interação de biomateriais com os sistemas biológicos. (Takayanagi, 2007).

Assim, as células imunes desempenham um papel importante tanto na fisiologia óssea, como em caso de doenças, produzindo substâncias químicas reguladoras, que influenciam na osteogênese. As células imunológicas mais importantes são os macrófagos (Lorenzo et al., 2008), pois desempenham papel crucial nas reações imunoinflamatórias de longo prazo, induzidas mediante a implantação dos biomateriais.

Os macrófagos que respondem a detritos de células mortas, bem como a infecções externas, são importantes células fagocitárias (Lorenzo et al., 2008; Takayanagi, 2005), que apresentam alta plasticidade intrínseca e atividade de polarização flexível nos subtipos M1 e M2. Esses dois subtipos de macrófagos são classicamente diferenciados com base em várias propriedades funcionais, marcadores de superfície e indutores (Xue et al., 2018).

Nesse contexto, o remodelamento ósseo é um processo fisiológico natural ajustado por ciclos contínuos de reabsorção e formação óssea, denominado *turnover* ósseo, que depende de uma intrincada interação entre osteoblastos e osteoclastos (Baht et al., 2023; Xue et al., 2018).

Nesse processo, a IL-6 surge como um mediador inflamatório que exerce a sua influência na ativação dos osteoclastos, tendo atuação na reabsorção óssea. Em cenários inflamatórios, níveis elevados de IL-6 podem aumentar a atividade dos osteoclastos, potencialmente levando à perda óssea excessiva (Hotchkiss et al., 2016; Mariani et al., 2019; Yan et al., 2020).

O TNF- α é um mediador inflamatório, que desempenha um papel fundamental na condução da ativação dos osteoclastos. Promove a diferenciação de células

precursoras em osteoclastos ativos e aumenta a atividade de reabsorção óssea (Mariani et al., 2019; Yan et al., 2020).

Entretanto, o IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória, que tem o potencial de impactar diretamente na atividade dos osteoclastos, regulando a expressão de moléculas, que influenciam efetivamente na sua função. Há relatos da sua interação com outros mediadores e células do sistema imunológico, que interferem no *turnover* ósseo, em cenários inflamatórios, ou seja, no equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea (Laquerriere et al., 2003; Mariani et al., 2019; Yan et al., 2020; Xue et al., 2018).

Os osteoblastos são células responsáveis pela formação da matriz óssea, são encarregados de sintetizar citocinas e fatores de crescimento, que regulam a atividade e a função dos osteoclastos. Dentre esses, o ativador do receptor do ligante Kappa B do fator nuclear (RANKL) e o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), desempenham papéis fundamentais na indução da osteoclastogênese. Logo, em seu papel de modular a resposta imune, os osteoblastos interagem com as citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10. Logo, essas citocinas estimulam a diferenciação e a atividade dos osteoblastos, promovendo assim a gênese de tecido ósseo recém formado, atuando no equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea (Gao et al., 2018; Yan et al., 2020).

1.4 Biovidros

Após a implantação de um biomaterial, ocorre sua alteração no microambiente, que como apresentado anteriormente, pode modular a resposta imunoinflamatória local (Zhao et al., 2020). Essa modulação ocorre em decorrência da interação do biomaterial com o tecido, resultando em alteração da composição química (íons metálicos, proteínas e biocompostos) e das propriedades físicas (tamanho das partículas, porosidade, tamanho dos poros e topologia) dos biomateriais (Wang, 2019).

Desse modo, surge uma nova classe de materiais bioativos, como os biovidros ativos, que apresentam ampla biocompatibilidade e versatilidade, relacionado ao processo de reparação e regeneração tecidual (Ma et al., 2017). Esses apresentam semelhança estrutural com o tecido natural, em especial com o tecido ósseo (Catteaux et al., 2023).

Assim, os biovidros não só apresentam enorme biocompatibilidade, mas também estabelecem fortes conexões com os tecidos, devido à sua propriedade de reação química nos fluidos corporais. Logo, esse biomaterial implantado no tecido ósseo atribui capacidade única de induzir a formação de uma camada de hidroxiapatita, que é um importante constituinte da matriz óssea (Nascimento, 2022).

De tal modo que o biovidro surge como um promissor candidato a atuar como protagonista no processo de cicatrização de defeitos ósseos e fraturas complexas, tendo como base estudos de biocompatibilidade e osteocondutividade (Al-Maawi et al., 2017; Moghanian et al., 2018; Xue et al., 2018., Kappaun et al., 2023).

Contudo, a incorporação de nanocristais na estrutura molecular de biovidros é inovador, o que possibilita a intensificação de diversas propriedades físicas, químicas e biológicas, as quais precisam ser melhor caracterizadas nas diversas aplicações clínicas. Nessa perspectiva, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um novo método de síntese, com a incorporação nanocristais de Dióxido de Titânio (TiO_2) na estrutura molecular de biovidros, no sistema vítreo SNCP ($\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$).

Desse modo, em vista a iniciar o processo de caracterização do potencial de aplicação clínica desses novos biocompostos, o objetivo do estudo foi avaliar a citotoxicidade e imunomodulação de novos biovidros nanoestruturados com TiO_2 , por meio da viabilidade em células sanguíneas humanas (PBMC), dosagem de citocinas e ensaio de sobrevivência em larvas de *Galleria mellonella*.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar da enorme variedade de materiais orgânicos e sintéticos capazes de substituir o tecido ósseo ou estimular a osteogênese reparacional, ainda não há no mercado um material que atenda a todos os requisitos desejados. Assim, o biovidro representa uma inovação promissora na área de biomateriais, trazendo consigo uma fusão fascinante entre a ciência dos materiais e as aplicações biológicas.

Nessa perspectiva, a inovação está relacionada à incorporação de nanocristais de dióxido de titânio na estrutura molecular do biovidro, tornando imprescindível a realização de novos estudos relacionado ao desenvolvimento de novos biovidros nanoestruturados e das análises das propriedades biológicas, em vista a determinar o potencial e segurança clínica desses novos biocompostos.

3 HIPÓTESE

A hipótese do estudo é que os nanocristais de íons titânio presentes na estrutura molecular dos biovidros, venha atuar positivamente, possibilitando a intensificação de diversas propriedades físicas, químicas e biológicas, as quais precisam ser melhor caracterizadas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a citotoxicidade e imunomodulação de novos biovidros nanoestruturados com TiO₂, por meio da viabilidade em células sanguíneas humanas (PBMC), dosagem de citocinas e ensaio de sobrevivência em larvas de *Galleria mellonella*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade de novos biovidros puro (Ti 0,00%) e nanoestruturados com TiO₂ (Ti 10,0%; Ti 20,0%; Ti 30,0%), por meio da análise de viabilidade em células sanguíneas humanas (PBMC);
- Analisar *in vitro* a capacidade de imunomodulação de novos biovidros puro (Ti 0,00%) e nanoestruturados com TiO₂ (Ti 10,0%; Ti 20,0%; Ti 30,0%), com base na concentração de citocinas Pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10).
- Avaliar *in vivo* a biocompatibilidade desses novos biovidros puro (Ti 0,00%) e nanoestruturados com TiO₂ (Ti 10,0%; Ti 20,0%; Ti 30,0%), por meio de ensaio de sobrevivência em larvas de *Galleria mellonella*.

5 MATERIAS E METODOS

5.1 Ensaio *in vitro* de biocompatibilidade em células humanas do sangue periférico

Os ensaios *in vitro* realizados em células humanas do sangue periférico, as células mononucleares (PBMCs) foram derivadas de células destinadas ao descarte de indivíduos saudáveis inscritos em estudos aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) sob os protocolos 852 e 1475.

As PBMCs foram coletadas e isoladas a partir de sangue total por gradiente de densidade Ficoll Histopaque (Sigma-Aldrich), seguindo as instruções do fabricante (Figura 1).

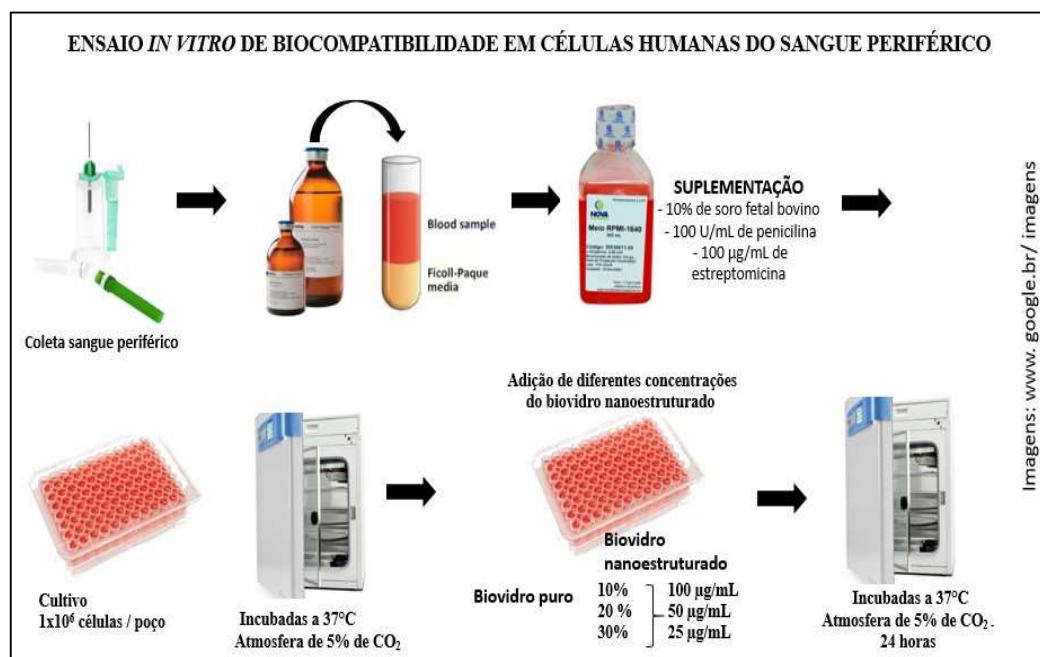


Figura 1: Representação esquemática do ensaio *in vitro* de biocompatibilidade em células humanas do sangue periférico

Na sequência, as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Life Technologies), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Life Technologies), e cultivadas em placas de cultura de 96 poços (Corning) com 1x10⁶ células por poço. As células foram incubadas a 37°C em uma atmosfera de

5% de CO₂. Os biovidros nanoestruturados com TiO₂ (10, 20 e 30 %), foram adicionados às células em cada poço em diferentes concentrações: 100, 50 e 25 µg/mL. As células foram incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Para testar a viabilidade celular, o ensaio de redução do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide - Sigma-Aldrich) foi realizado seguindo instruções do fabricante. Após o tratamento com os biovidros nanoestruturados as células foram incubadas em 10 µl de MTT por 4 horas. Após incubação, adicionou-se a solução de solubilização dos cristais formados e a absorbância determinada nos comprimentos de onda de 540 e 690 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade em comparação com grupos não-tratados (Figura 2).

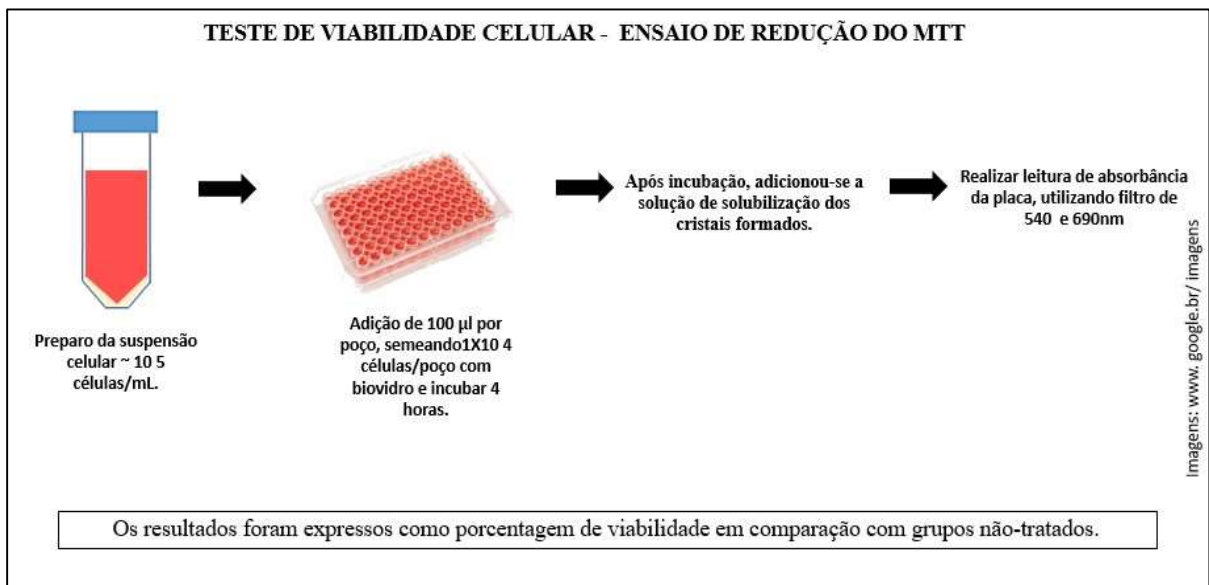


Figura 2: Representação esquemática do teste de viabilidade – Ensaio de redução do MTT.

5.2 Quantificação de Citocinas

As concentrações de citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6 e IL-10) foram determinados por ELISA usando os sobrenadantes da cultura celular, como anteriormente descrito. Kits BD ELISA OptEIA® específicos para cada citocina foram usados, seguindo recomendações especificadas pelo fabricante. Os resultados foram obtidos usando o EnSpire® Espectrofotômetro leitor de placas multimodo em um comprimento de onda de 460 a 540 nm (Figura 3).

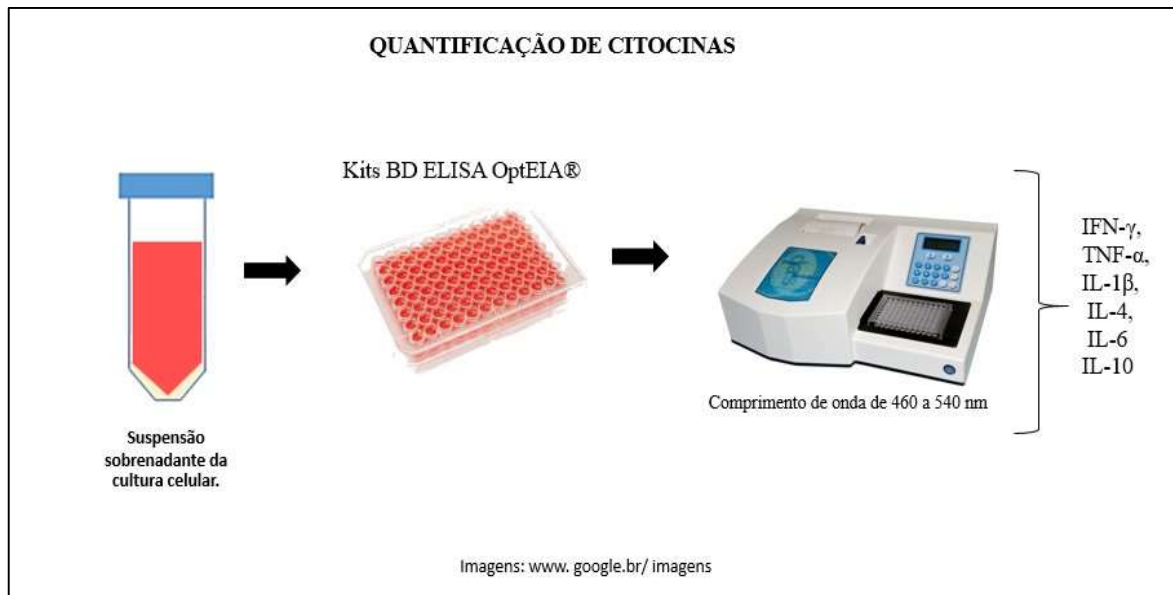


Figura 3: Representação esquemática do processo de quantificação de citocinas

5.3 Ensaio de Sobrevivência em Larvas de *Galleria mellonella*

Foram utilizadas larvas de *Galleria mellonella* no último instar que não apresentaram melanização ou qualquer sinal de contaminação. O peso dos animais utilizados foi de 0,2 a 0,3 gramas. Para a curva de sobrevivência, 10 μ l das suspensões contendo os biovidros diluídos (100 μ g/larva) em PBS + 10% de DMSO foram inoculados na última pró-leg da esquerda do animal com auxílio de seringa de Hemilton. O grupo controle recebeu apenas inóculo com PBS + 10% de DMSO. A sobrevivência dos animais foi determinada em intervalos de 12 horas durante 10 dias. Foram considerados mortos, animais que não responderam à estímulo mecânico e apresentaram forte melanização. Foram utilizados grupos de 10 animais por composto. Todos os experimentos foram repetidos ao menos três vezes. Os dados de sobrevivência foram apresentados em curva de Kaplan-Meier e as análises estatísticas realizadas por teste de Log-rank e de Gehan-Breslow-Wilcoxon (Figura 4).

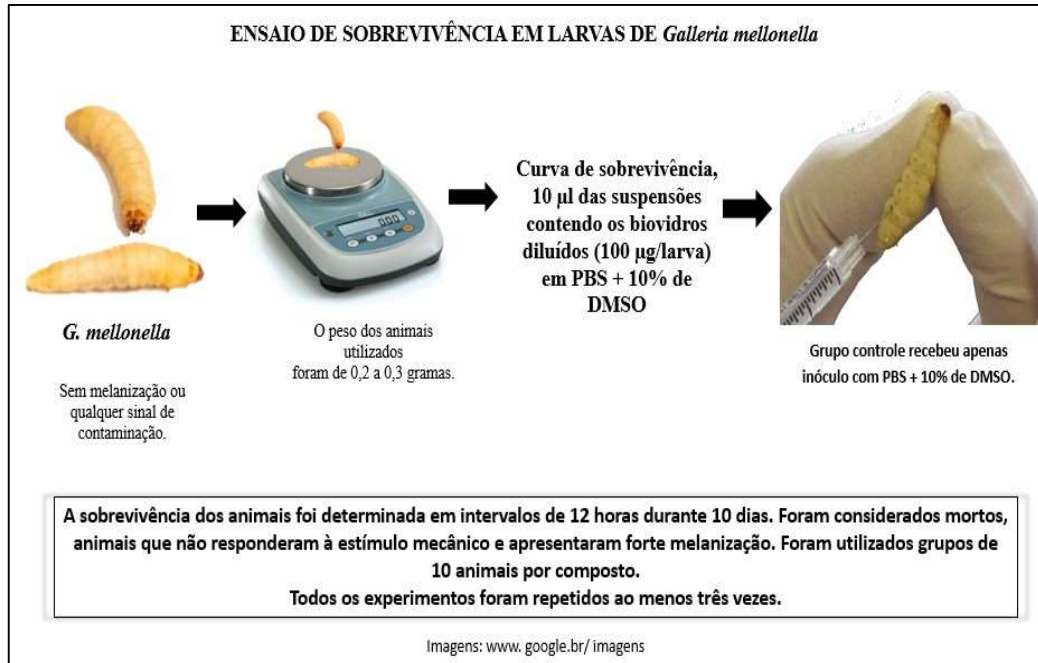


Figura 4: Representação esquemática do ensaio de sobrevivência em larvas de *Galleria mellonella*.

5.4 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism (versão 8.1, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$) e os dados foram apresentados média \pm erro padrão. Os dados de sobrevivência foram apresentados como curvas de Kaplan-Meier e as análises estatísticas foram realizadas usando os testes Log-rank e Gehan-Breslow-Wilcoxon.

REFERÊNCIAS

- AL-MAAWI, S.; ORLOWSKA, A.; SADER, R.; JAMES KIRKPATRICK, C.; GHANAATI, S. In vivo cellular reactions to different biomaterials-Physiological and pathological aspects and their consequences. **Semin Immunol.**, v. 29, n. 01, p. 49-61. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.06.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532317300118?via%3Dihub>. Acesso em: 07 jan.2024.
- AMBROSIO, L.; RAUCCI, M. G.; VADALA, G.; AMBROSIO, L.; PAPALIA, R.; DENARO, V. Innovative Biomaterials for the Treatment of Bone Cancer. **Int J Mol Sci.**, v. 22, n. 01. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22158214>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/15/8214>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- ARRON, J. R., CHOI, Y. Bone versus immune system. **Nature.**, v. 408, n. 6, p. 535. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1038/35046196>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35046196>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- BAHT GS, VI L, ALMAN BA. The Role of the Immune Cells in Fracture Healing. **Curr Osteoporos.**, v. 16, n. 02, p. 138- 145. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11914-018-0423-2>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11914-018-0423-2>. Acesso em: 20 fev. 2024.
- CATTEAUX R, GRATTEPANCHE-LEBECQ I, DÉSANGLOIS F, CHAI F, HORNEZ JC, HAMPSHIRE S. Synthesis, characterization and bioactivity of bioglasses in the Na₂O-CaO-P₂O₅-SiO₂ system prepared via sol gel processing. **Chem Eng Res Des.**, v. 91, n. 12 p. 2420–6. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.05.017>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0263876213002116>. Acesso em: 22 fev. 2024.
- CHENG, L. C., JIANG, X., WANG, J., CHEN, C. E LIU, R.-S. Nano–bio effects: interaction of nanomaterials with cells. **Nanoscale.**, v. 05, n. 01, p. 3547- 3547. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3NR34276J>. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/nr/c3nr34276j>. Acesso em: 15 jan. 2024.
- COSTA, B. H.; REZENDE, A. K.; COSTA, L.; NEVES, G. F. M.; SHIMANO, A. C.; PENONI, A. O.; CARVALHO, C. R.; COSTA, R. A., ALVARENGA, E. C. Systemic effects of oral tolerance in bone healing. *Sci Rep.* V.13, 6296. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33591-4>. Acesso em: 25 jul. 2024.
- GAO, L.; LI, M.; YIN, L.; ZHAO, C.; CHEN, J.; ZHOU, J.; DUAN, K.; FENG, B. Dual-inflammatory cytokines on TiO(2) nanotube-coated surfaces used for regulating macrophage polarization in bone implants. **J Biomed Mater Res.**, v. 106, n. 01, p. 1878-1886. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36391>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29524297/>. Acesso em: 13 mar. 2024.

GAO, L.; LI, M.; YIN, L.; ZHAO, C.; CHEN, J.; ZHOU, J.; DUAN, K.; FENG, B. Dual-inflammatory cytokines on TiO₂ nanotube-coated surfaces used for regulating macrophage polarization in bone implants. **J Biomed Mater Res.**, v. 106, n. 01, p. 1878-1886. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36391>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29524297/>. Acesso em: 13 mar. 2024.

HOTCHKISS, K.M.; REDDY, G.B.; HYZY, S.L.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B.D.; OLIVARES-NAVARRETE, R. Titanium surface characteristics, including topography and wettability, alter macrophage activation. **Acta Biomater.**, v. 31, n. 01, p. 425-434. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.12.003>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26675126/>. Acesso em: 22 mar. 2024.

KIM, S.H.; SEO, Y.B.; YEON, Y.K.; LEE, Y.J.; PARK, H.S.; SULTAN, M.T.; LEE, J.M.; LEE, J.S.; LEE, O.J.; HONG, H. 4D-bioprinted silk hydrogels for tissue engineering. **Biomaterials.**, v. 260, n. 01, p. 281. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120281>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0142961220305275>. Acesso em: 22 mai. 2024.

KOPEC, M.; BETON, K.; JARCZEWSKA, K.; ABRAMCZYK, H. Hyperglycemia and cancer in human lung carcinoma by means of Raman spectroscopy and imaging. **Sci Rep.**, v. 12, n. 01, p. 18561. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21483-y>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-21483-y>. Acesso em: 21 mai. 2024.

LAQUERRIERE, P.; GRANDJEAN-LAQUERRIERE, A.; JALLOT, E.; BALOSSIER, G.; FRAYSSINET, P.; GUENOUNOU, M. Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes in vitro. **Biomaterials.**, v. 24, n. 01, p. 2739-2747. 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00089-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00089-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0142961203000899>. Acesso em: 24 mai. 2024.

LIMMER, A.; WIRTZ, D.C. Osteoimmunology: Influence of the Immune System on Bone Regeneration and Consumption. **Orthop Unfall.**, v. 155, n. p. 273-280. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0043-100100>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28683495/>. Acesso em: 24 jan. 2024.

LORENZO J, HOROWITZ M, CHOI Y. Osteoimmunology: Interactions of the Bone and Immune System. **Endocrine Reviews.**, v. 29, n. 04, p. 403-440. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1210/er.2007-0038>. Disponível em: <https://academic.oup.com/edrv/article/29/4/403/2354973>. Acesso em: 22 mai. 2024.

MA, Q.; WANG, T.; MENG, Q.; XU, X.; WU, H.; XU, D.; CHEN, Y. Comparison of in vitro dentinal tubule occluding efficacy of two different methods using a nanoscaled bioactive glass-containing desensitising agent. **J Dent.**, v. 60, n. 01, p. 63-69. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.03.001>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28267581/>. Acesso em: 03 fev. 2024.

MARIANI, E.; LISIGNOLI, G.; BORZI, R.M.; PULSATELLI, L. Biomaterials: Foreign Bodies or Tuners for the Immune Response. **Int J Mol Sci.**, v. 20, n. 03, p. 636.

2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20030636>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30717232/>. Acesso em: 03 fev. 2024.

MARIN, E., BOSCHETTO, F., & PEZZOTTI, G. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. **J Biomed Mater Res.**, v. 108, n. 08, p1617-1633. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36930>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32196949/>. Acesso em: 15 fev. 2024.

MINARDI, S., TARABALLI, F., PANDOLFI, L. E TASCOTTI, E. Patterning Biomaterials for the Spatiotemporal Delivery of Bioactive Molecules. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.**, v. 4, p. 45. 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00045>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2016.00045/full>. Acesso em: 20 nov. 2023.

MOGHANIAN A, FIROOZI S, TAHRIRI M, SEDGHI A. A comparative study on the in vitro formation of hydroxyapatite, cytotoxicity and antibacterial activity of 58S bioactive glass substituted by Li and Sr. **Mater Sci Eng.**, v. 91, n. 60, p. 349-360. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.058>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30033264/>. Acesso em: 17 nov. 2023.

NASCIMENTO M. Interação Célula-Proteína-Implante no Processo de Osseointegração. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences.** v. 4, n. 2, p. 44-59. 2022. DOI: [10.36557/2674-8169.2022v4n2p44-59](https://doi.org/10.36557/2674-8169.2022v4n2p44-59). Acesso em: 23 nov. 2023.

OTHMAN, Z.; CILLERO PASTOR, B.; VAN RIJT, S.; HABIBOVIC, P. Understanding interactions between biomaterials and biological systems using proteomics. **Biomaterials.**, v. 167, n. 01, p. 191-204. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.03.020>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29571054/>. Acesso em: 13 jan. 2024.

PAJARINEN, J.; LIN, T.; GIBON, E.; KOHNO, Y.; MARUYAMA, M.; NATHAN, K.; LU, L.; YAO, Z.; GOODMAN, S.B. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. **Biomaterials.**, v. 196, n. 01, p. 80-89. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.12.025>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29329642/>. Acesso em: 10 jan. 2024.

SUWARDI, A.; WANG, F.; XUE, K.; HAN, M.Y.; TEO, P.; WANG, P.; WANG, S.; LIU, Y.; YE, E.; LI, Z. Machine Learning-Driven Biomaterials Evolution. **Adv Mater.**, v. 34, n. 1, p. 2102703. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.202102703>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34617632/>. Acesso em: 04 jan. 2024.

SZCZESNY, G.; KOPEC, M.; POLITIS, D.J.; KOWALEWSKI, Z.L.; LAZARSKI, A.; SZOLC, T. A Review on Biomaterials for Orthopaedic Surgery and Traumatology: From Past to Present. **Materials (Basel).**, v. 15, n. 10, p. 3622. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma15103622>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35629649/>. Acesso em: 14 jan. 2024.

TAKAYANAGI, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **J Periodontal Res.**, v. 40, n. 01, p. 287-293. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600->

0765.2005.00814.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15966905/>. Acesso em: 03 mai. 2024.

TAKAYANAGI, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. **Nat Rev Immunol.**, v.07, n. 01, p. 292-304. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri2062>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri2062>. Acesso em: 03 fev. 2024.

WANG, Z.; ZHANG, W.; XIE, C.; WEN, F.; MA, C.; LIN, N.; THIAN, E.S.; WANG, X. Geometric anisotropy on biomaterials surface for vascular scaffold design: engineering and biological advances. **Journal of Physics: Materials.**, v. 02, n. 03, p. 032033. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1088/2515-7639/ab1c68>. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/2515-7639/ab1c68/meta>. Acesso em: 05 jan. 2024.

XIE, Y.; HU, C.; FENG, Y.; LI, D.; AI, T.; HUANG, Y.; CHEN, X.; HUANG, L.; TAN, J. Osteoimmunomodulatory effects of biomaterial modification strategies on macrophage polarization and bone regeneration. **Regen Biomater.**, v. 7, n. 03, p. 233-245. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/rb/rbaa006>. Disponível em: <https://academic.oup.com/rb/article/7/3/233/5835252>. Acesso em: 14 jan. 2024.

XUE, Q.; YAN, Y.; ZHANG, R.; XIONG, H. Regulation of iNOS on immune cells and its role in diseases. **International journal of molecular sciences.**, v. 19, n. 12, p. 3805. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19123805>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30501075/>. Acesso em: 17 fev. 2024.

XUE, Y.; CHE, J.; JI, X.; LI, Y.; XIE, J.; CHEN, X. Recent advances in biomaterial-boosted adoptive cell therapy. **Chem Soc Rev.**, v. 51, n. 01, p. 1766-1794. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1039/D1CS00786F>. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2022/cs/d1cs00786f>. Acesso em: 17 fev. 2024.

YAN, X.; SHEN, K.; TANG, Q.; FANG, X.; ZHANG, C.; ZHU, Z.; HOU, Y.; LAI, M. IL-4 functionalized titanium dioxide nanotubes modulate the inflammatory response of macrophages. **J Biomater Sci Polym Ed.**, v. 31, n. 17, p. 2238-2251. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1799534>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32693732/>. Acesso em: 10 mar. 2024.

ZHAO, Z.; ZHAO, Q.; GU, B.; YIN, C.; SHEN, K.; TANG, H.; XIA, H.; ZHANG, X.; ZHAO, Y.; YANG, X. Minimally invasive implantation and decreased inflammation reduce osteoinduction of biomaterial. **Theranostics.**, v. 10, n. 08, p. 3533-3545. 2020. DOI: <https://doi.org/10.7150/thno.39507>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32206106/>. Acesso em: 26 fev. 2024.

6 APÊNDICE A - ARTIGO SUBMETIDO

NANOSTRUCTURED BIOGLASS WITH TiO₂ NANOPARTICLES: ASSESSING BIOCOMPATIBILITY AND IMMUNOMODULATION

ABSTRACT

Bioglass doped with metallic ions enhances its stability and may correlate with improved outcomes in orthopedic applications and broader implications for human health. Concurrently, TiO₂ nanoparticles have been widely utilized in the medical field and everyday human products. This study evaluates the immunomodulatory capacity through cytokine production and the in vivo and in vitro toxicity of pure bioglass (SNCP) and nanostructured SNCP with TiO₂ at concentrations of 10%, 20%, and 30%. Our results indicate that treatments with both pure and nanostructured bioglass (SNCP) lead to increased secretion of IFN- γ , IL-1 β , and IL-6 by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), while TNF- α secretion is reduced. Cytotoxicity assays revealed that pure bioglass (SNCP) and nanostructured bioglass (SNCP) containing 10% titanium (Ti) exhibited lower cytotoxicity compared to formulations containing 20% and 30% TiO₂ in PBMCs. However, in vivo experiments using the *Galleria mellonella* larvae model demonstrated an absence of toxicity even at higher concentrations the bioglass SNCP (100 μ g/larvae). These findings suggest that the incorporation of TiO₂ into bioglass (SNCP) may enhance its biological properties.

Keywords: Cytotoxicity, nanotechnology, bone regeneration, *Galleria mellonella*.

INTRODUCTION

Since the pioneering synthesis of bioceramics by Larry Hench in 1969 and the subsequent formulation of bioglass, the research and applications of these materials have expanded exponentially (Placek et al. 2016). Among the primary and most promising applications of these biomaterials is their use in orthopedics (Hench 2006, Jones 2013). In the orthopedic field, these applications include the production of biomaterials, such as biopolymers, for the filling and reconstruction of bone lesions and defects, as well as for the coating of orthopedic implants. These strategies aim to advance bone tissue engineering effectively (Casaletto et al. 2001). The use of bioglass, either as particulates or pastes, in combination with various compounds, has been extensively studied in contexts such as polyalkenoate-based cements for bone regeneration (Wren et al. 2011a, Wren et al. 2008) and glass-ceramic scaffolds (Chen et al. 2006, Haimi et al. 2009). Beyond orthopedic applications, bioglass microspheres have shown potential efficacy in cancer treatment (Anderson et al. 1992, Bortot et al. 2012).

The biological effects of bioglass involve its ability to bond with bone areas undergoing regeneration through the formation of a hydroxyapatite layer (Bargavi et al. 2018). Interaction of bioglass with the host environment facilitates the dissolution of the glass surface and ionic exchange, primarily through the presence of Ca^{2+} ions (Kokubo et al. 2003, Kokubo and Takadama 2006). Cations like Ca^{2+} play a crucial role in the structural integrity of the network, directly influencing the resistance and bioproperties of the bioglass. These molecules affect ion release and pH levels, which are closely tied to the efficacy and action of the bioglass (Wren et al. 2011b, Calas et al. 2002). The interaction of calcium ions with hydroxyapatite results in the formation of calcium hydroxyapatite, leading to the release of calcium phosphate. This compound interacts with adjacent proteins, creating an environment conducive to bone cell attachment and proliferation (Bargavi et al. 2018). These processes stimulate osteogenesis and subsequent bone tissue regeneration (Hench 2006, Jones 2013). Furthermore, silicate-based bioglass has demonstrated the ability to induce angiogenesis and upregulate genes associated with osteoblast regeneration (Hoppe et al. 2011, Hench 2009).

Although the interaction of bioglass with bone cells and its role in promoting bone regeneration have been previously reported, the integration of bioglass with platforms providing stability is often necessary (Bargavi et al. 2018, Fang et al. 2012).

In this context, combining bioglass with metallic compounds may enhance the efficiency of bioglass for applications in human health (Bargavi et al. 2018, Placek et al. 2016).

Titanium dioxide (TiO_2) exhibits strong chemical inertness and is widely used in various products for daily human use (cosmetics, food, paper, plastics, etc.) due to its safety characteristics (Fries and Simko 2012, Skocaj et al. 2011). TiO_2 nanoparticles (NPs) demonstrate superior refractive index, conductivity, permeability, reactivity, photocatalytic activity, and lower transmittance compared to larger particles (Shi et al. 2022). These attractive properties position TiO_2 NPs as a significant raw material to produce basic hygiene products, such as toothpaste, and in the pharmaceutical industry as drug carriers or in light-driven treatments (Ziental et al. 2020). However, the increased mass-to-volume ratio of TiO_2 NPs may enhance their toxicity and impact their biocompatibility (Wang et al. 2007, Ze et al. 2016).

The incorporation of TiO_2 into the bioglass structure enhances the material's mechanical strength without compromising biocompatibility (5-6). Doping silicate bioglass with TiO_2 (25-30% wt %) results in network modification of the glass, increasing the number of non-bridging oxygen species (Wren et al. 2011a, Kaviyarasu et al. 2017). The interaction between the glass and TiO_2 also improves osteoblast viability and enhances the surface's amenability to cell adhesion (Placek et al. 2016). Given the positive interaction between bioglass and TiO_2 , this study aims to evaluate the biocompatibility of TiO_2 NP-doped nanostructured bioglass and assess the immunomodulatory capacity of these compounds.

MATERIAL AND METHODS

Cytotoxicity in vitro in Human Peripheral Blood Cells (PBMCs)

For the in vitro assays conducted on human peripheral blood cells, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected and isolated from whole blood using a Ficoll-Hypaque density gradient (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's instructions. Subsequently, the cells were resuspended in RPMI 1640 culture medium (Gibco, Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Life Technologies), 100 U/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (Gibco, Life Technologies), and cultured in 96-well culture plates (Corning) at a

density of 1×10^6 cells per well. The cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

The pure bioglass (SNCP) and TiO₂ nanostructured bioactive glass (10, 20 and 30 % wt of TiO₂) at the final concentrations of 100, 50 and 25 µg/mL were added to the cells in each well. The cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 24 hours. To assess cell viability, the MTT reduction assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide - Sigma-Aldrich) was performed following the manufacturer's instructions (Sigma). After treatment with the compounds, the cells were incubated with [10 µ] (10, 20 and 30% of TiO₂) (of MTT for 4 hours. Post-incubation, the solution for dissolving the formed crystals was added, and the absorbance was measured at wavelengths of 540 and 690 nm. The results were expressed as a percentage of viability compared to untreated control groups. All assays were performed in triplicate at three times.

The PBMCs used were derived from cells designated for disposal from healthy individuals enrolled in studies approved by the ethics committee of the Federal University of the Triângulo Mineiro (UFTM) under protocols numbered 852 and 1475.

Cytokine Quantification

The concentrations of cytokines (IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-4, IL-6, and IL-10) were determined by ELISA method using the cell culture supernatants, as previously described. Specific BD ELISA OptEIA® kits for each cytokine were used, following the test recommendations specified by the manufacturer. The results were obtained using the EnSpire® Multimode Plate Reader at a wavelength range of 460 to 540 nm.

Survival Assay in *Galleria mellonella* Larvae

Galleria mellonella larvae in the final instar, which showed no melanization or any signs of contamination, were used. The weight of the animals used ranged from 0.2 to 0.3 grams. For the survival curve, 10 µl of the suspensions containing the diluted bioactive glass (10, 20 and 30% of TiO₂ - 100 µg/larva) in PBS + 10% DMSO were inoculated into the last left pro-leg of the animal using a Hamilton syringe. The control group received only inoculum with PBS + 10% DMSO. The survival of the animals was determined at 12-hour intervals over 10 days. Animals that did not

respond to mechanical stimuli and showed strong melanization were considered dead. Groups of 10 animals per compound were used. All experiments were repeated at least three times.

Statistical analysis

The statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software (version 8.1, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Parametric data were subjected to two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test to means comparison. We adopted the significance level of 5%, and the data are shown as mean \pm standard error of the mean (EPM). Survival data were presented as Kaplan-Meier curves and statistical analyses were performed using the Log-rank and Gehan-Breslow-Wilcoxon tests.

RESULTS

Cytotoxicity *in vitro* in Human Peripheral Blood Cells (PBMCs)

To elucidate the immunomodulatory effects of pure and nanostructured bioglass, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were treated with different concentrations of these compounds. This treatment resulted in an elevation in the production of pro-inflammatory cytokines (Fig.1). Treatment with pure bioglass (SNCP) showed stimulation of production of IFN- γ at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and IL-1 β . The biomaterial formulations also led to a significant increase in the secretion of these cytokines. The data indicate that doping with TiO₂ at 20% and 30% stimulates the production of IFN- γ at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A similar effect was observed for 20% TiO₂ at a concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

The increase of cytokines production was maintained for IL-1 β with TiO₂ at 10%, 20%, and 30% Ti at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, as well as with 30% TiO₂ at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The production of IL-6 was higher at all concentrations used when compared to the control (PBMCs without treatment). In the case of TNF- α , a negative modulation was observed; the higher the concentration of TiO₂, the lower the production of TNF- α . Regarding the anti-inflammatory cytokine IL-10, a reduction in production was observed after treatment, particularly with SNCP and 10% TiO₂ at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and with 10% and 20% TiO₂ at concentrations of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

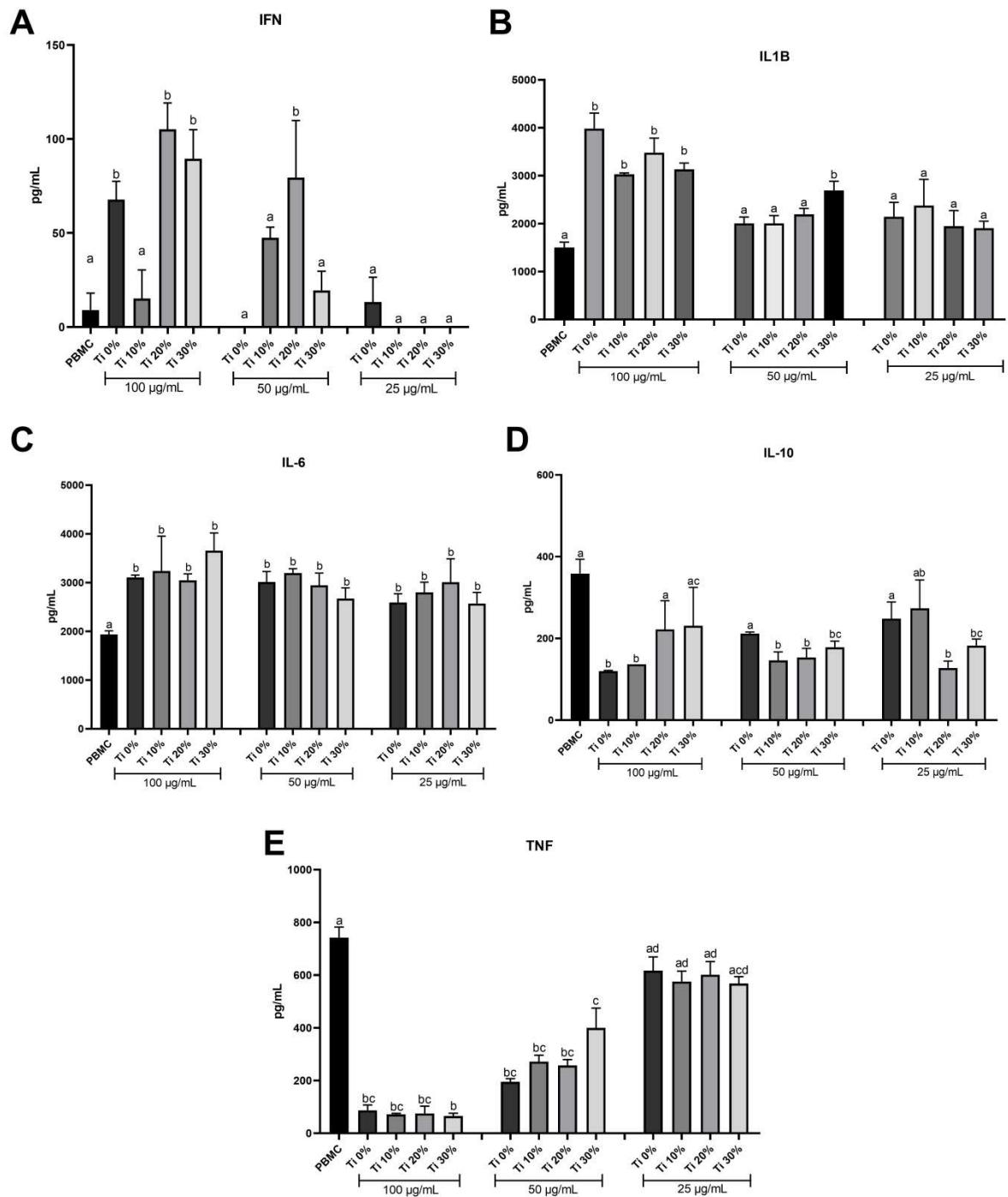


Figure 1: Cytokine production of human peripheral blood cells (PBMCs) after treatment with 100, 50 and 25 µg/mL of pure bioglass (Ti 0%) and nanostructured with TiO₂ (Ti 10%, Ti 20% and Ti 30%) for 24h. IFN-γ (A), IL-1β (B), IL-6 (C), IL-10 (D) and TNF-α (E). Equal letters indicate no statistical differences ($p < 0.05$).

Cytotoxicity *in vitro* in Human Peripheral Blood Cells (PBMCs)

The cytotoxicity assay against peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) revealed that all tested compounds (SNCP and nanostructured SNCP) exhibited some level of cytotoxicity (5-65%) compared to untreated conditions (Fig. 2). However, an increased cytotoxicity was observed at higher concentrations of titanium (20% and 30%) across all tested dilutions (100, 50, and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). No significant difference in toxicity was noted between pure SNCP and SNCP doped with 10% Ti under any of the tested conditions.

r

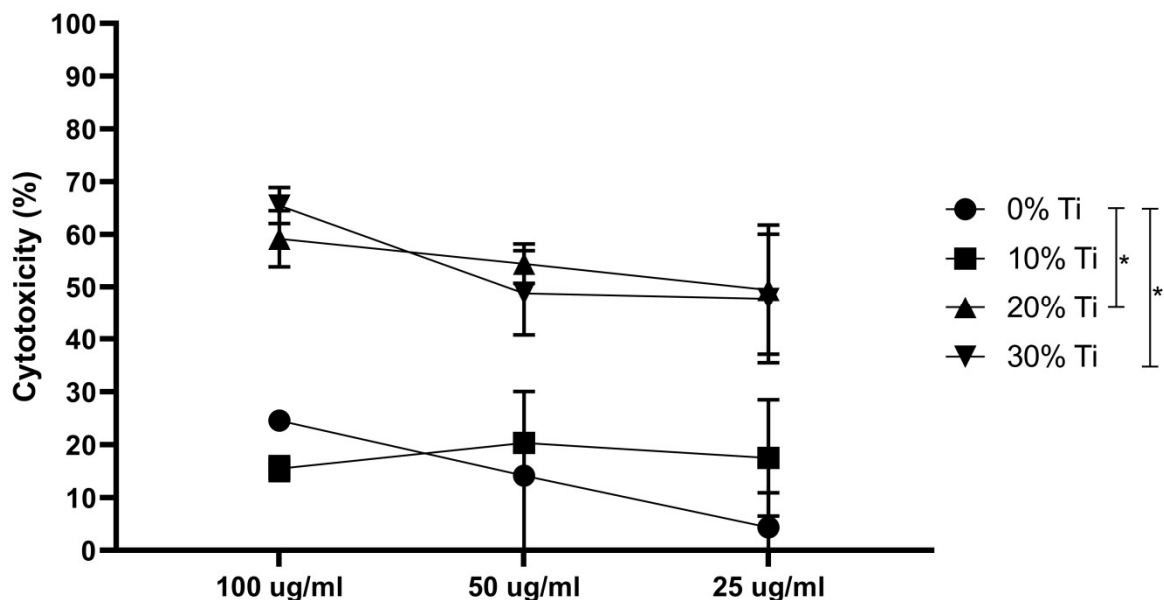


Figure 2: Percentage of cytotoxicity of pure bioglass (Ti 0%) and nanostructured with TiO_2 (Ti 10%, Ti 20% and Ti 30%) against human peripheral blood cells (PBMCs) by MTT reduction method. * $p < 0.05$.

Survival Assay in *Galleria mellonella* Larvae

In vivo toxicity assay was conducted using the survival analysis of the *Galleria mellonella* larvae model (Fig. 3). Bioglass doped with 20% Ti resulted in 10% mortality of the experimental group after 60 hours post-inoculation and 30% mortality by the end of the experiment, while bioglass doped with 10% Ti resulted in 10% mortality of the experimental group. Despite the observed larval mortality, there was

no significant difference in the *in vivo* toxicity of all tested compounds against the *G. mellonella* model under these conditions.

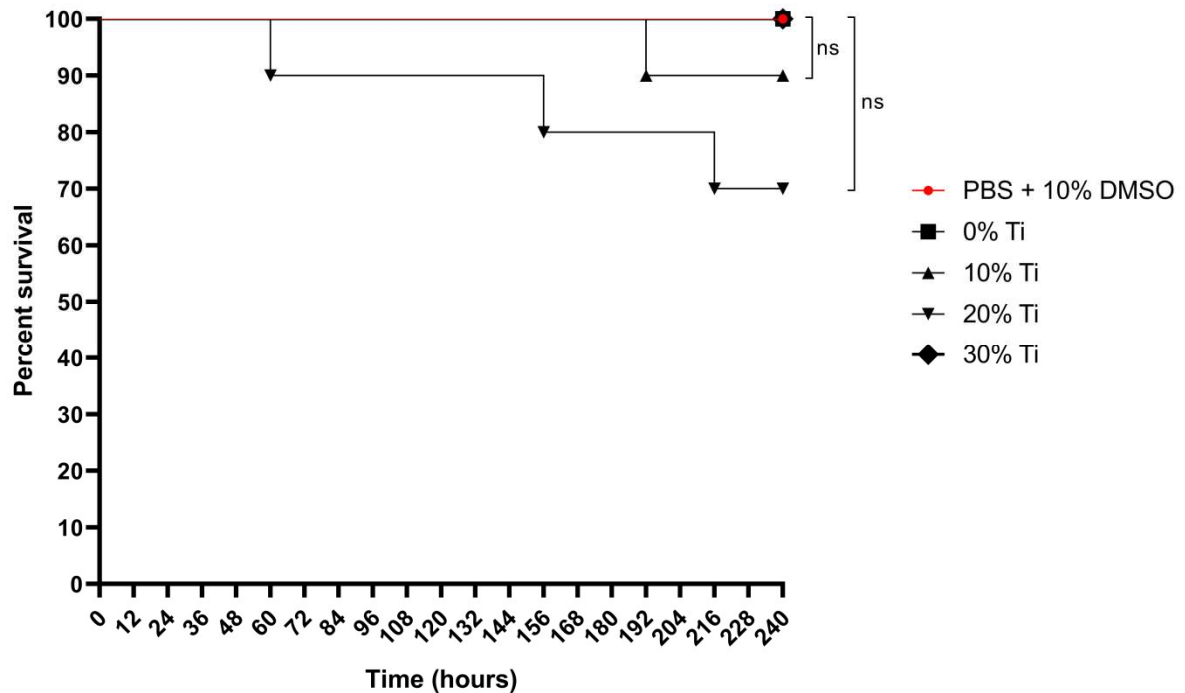


Figure 3: Kaplan-Meier survival curve of *Galleria mellonella* larvae inoculated with 100 µg of pure bioglass (Ti 0%) and bioglass nanostructured with TiO₂ (Ti 10%, Ti 20% and Ti 30%). Ns indicates non-significant differences ($p < 0.05$).

DISCUSSION

The efficacy and safety of biomaterials are widely acknowledged for their ability to influence the inflammatory response and show adequate biocompatibility. Nanostructured bioglasses with titanium addition demonstrate significant capacity to regulate inflammatory cytokines, which are crucial for the initial immune response following the contact of biomaterials (Asif et al. 2014). This immune response is rapid and similar to that triggered by microbiological or other acute threats, characterized by elevated levels of interleukin IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IFN- γ . This is unsurprising, considering the repertoire of cytokines and chemokines typically produced by monocyte cells in response to antigenic stimulation (Lappas 2015).

In this study, regarding the production of IFN- γ , only pure bioglass (SNCP) was able to induce its production. This cytokine is known to activate macrophages

and induce them into the M1 phenotype, a pro-inflammatory state that enhances antigen presentation capacity, phagocytosis, and the production of other pro-inflammatory cytokines and effector molecules (Mantovani et al. 2004). The IL-1 β is pivotal in the pathogenesis of various conditions, acting through interaction with membrane receptors (Symons et al. 1995)

IL-6 is modulated in various ways by biomaterials. Our results show an increase in the production of this cytokine by pure bioglass and this characteristic was maintained after nanostructuring with Ti in all concentrations tested. Hotchkiss et al. (2016) demonstrated that the production of pro-inflammatory cytokines in the initial hours post contact of biomaterials is critically necessary. However, reducing these levels subsequently is necessary to allow macrophage polarization towards the M2 phenotype, which is anti-inflammatory (Hotchkiss et al. 2016).

The production of TNF- α depends on the concentration of the biomaterials. Higher concentrations of SNCP and titanium correspond to lower production of TNF- α . Studies show that particulate bioglass induces the release of inflammatory cytokines, such as TNF- α , at concentrations of 1 and 10 $\mu\text{g/mL}$ (Bendall et al. 1998). Research on smooth titanium and raw hydrophilic titanium indicates that smooth titanium induces higher production of pro-inflammatory cytokines, including TNF- α , whereas raw hydrophilic titanium can induce macrophages to the M2 phenotype, resulting in lower TNF- α production (Anderson et al. 2008). It is believed that a similar effect occurs with bioglass and titanium, where lower concentrations lead to higher production.

Our study showed that nanostructured bioglass with titanium can modulate IL-10 production both positively and negatively. Biomaterials are known to influence IL-10 production in various ways, depending on the material type and clinical application. Some biomaterials, such as bioactive glass, can activate the Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling pathway in macrophages, leading to IL-10 production (Laquerriere et al. 2003). Other biomaterials can control the release of immunomodulatory drugs, such as transforming growth factor-beta (TGF-beta) and interferon-gamma (IFN-gamma), which regulate IL-10 production by immune cells. During the healing process, IL-10 is essential, altering macrophage polarization to M2, creating a positive feedback loop that increases IL-10 production, decreases

phagocytic activity of cells, and enhances tissue remodeling and angiogenesis (Mariani et al. 2019).

Although the immunomodulatory capacity was analyzed, the biocompatibility of both standard and nanostructured bioglass was assessed through *in vivo* and *in vitro* assays. Our data indicate that Ti-nanostructured bioglass containing 20% and 30% titanium showed increased toxicity towards peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (Figure 2). However, the bioglass doped with 10% titanium exhibited lower toxicity, even at higher concentrations (100 µg/mL), suggesting that the benefits of TiO₂ nanoparticle doping may reach a saturation point. The integration of Ti⁴⁺ into the bioglass structure has previously been shown to alter leukocyte viability (Wang et al. 1996) and enhance T-lymphocyte activity (Chan et al. 2009). The ionic exchange mechanism is crucial for the functionality and interaction of bioglass in various applications. Bioglass doped with Ti⁴⁺ at ion concentrations between 0.1 and 10 µg/mL does not significantly affect osteoblast viability, whereas higher concentrations (20 µg/mL) increase cytotoxicity (Sun et al. 1997, Liao et al. 1999).

When biocompatibility was evaluated using an animal model, no toxicity was observed for the all tested compounds (Figure 3). The larvae of *G. mellonella* have been well-characterized as an alternative model to mammals for toxicity tests (Allegra et al. 2018, Ignasiak and Maxwell 2017, Maguire et al. 2016, Piatek et al. 2021). In toxicological studies, results derived from cell culture assays often, in some cases, overestimate compound toxicity. In this context, *G. mellonella* provides a valuable model for obtaining more accurate *in vivo* toxicity data (Allegra et al. 2018). Here, we demonstrated that nanostructured bioglass with higher titanium concentrations (20% and 30%) displayed increased toxicity *in vitro* (Figure 2). However, no toxicity of pure and nanostructured bioglass was observed *in vivo*, even at concentrations 100 times greater than those tested in cell culture (100 µg per larvae, equivalent to 10,000 µg/mL), suggesting the potential safety of its application.

CONCLUSION

In this study we showed the cytokines immunomodulation capacity of titanium nanostructured bioglass. The greater concentration of Ti-doped bioglass interferes with their cytotoxicity but not in toxicity *in vivo*. Therefore, TiO₂ nanoparticles have enormous potential for clinical application, but require further investigation.

REFERENCES

- ALLEGRA E, TITBALL RW, CARTER J AND CHAMPION OL. 2018. *Galleria mellonella* larvae allow the discrimination of toxic and non-toxic chemicals. *Chemosphere* 198: 469-472.
- ANDERSON JH, GOLDBERG JA, BESSENT RG, KERR DJ, MCKILLOP JH, STEWART I, COOKE TG, MCARDLE CSJR AND ONCOLOGY. 1992. Glass yttrium-90 microspheres for patients with colorectal liver metastases. 25: 137-139.
- ANDERSON JM, RODRIGUEZ A AND CHANG DT. 2008. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in immunology* 20: 86-100.
- ASIF IM, SHELTON RM, COOPER PR, ADDISON O AND MARTIN RA. 2014. In vitro bioactivity of titanium-doped bioglass. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 25: 1865-1873.
- BARGAVI P, CHITRA S, DURGALAKSHMI D, RAJASHREE P AND BALAKUMAR S. 2018. Effect of Titania Concentration in Bioglass/TiO₂ Nanostructures and Its In Vitro Biological Property Assessment. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 18: 4746-4754.
- BENDALL SP, GAIES M, FRONDOZA C, JINNAH RH AND HUNGERFORD DS. 1998. Effect of particulate bioactive glass on human synoviocyte cultures. 41: 392-397.
- BORTOT M, PRASTALO S AND PRADO MJPM. 2012. Production and characterization of glass microspheres for hepatic cancer treatment. 1: 351-358.
- CALAS G, CORMIER L, GALOISY L AND JOLLIVET PJCRC. 2002. Structure–property relationships in multicomponent oxide glasses. 5: 831-843.
- CASALETTO MP, INGO GM, KACIULIS S, MATTOGNO G, PANDOLFI L AND SCAVIA G. 2001. Surface studies of in vitro biocompatibility of titanium oxide coatings. *Applied Surface Science* 172: 167-177.
- CHAN EP, MHAWI A, CLODE P, SAUNDERS M AND FILGUEIRA LJM. 2009. Effects of titanium (iv) ions on human monocyte-derived dendritic cells. 1: 166-174.
- CHEN QZ, THOMPSON ID AND BOCCACCINI ARJB. 2006. 45S5 Bioglass®-derived glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering. 27: 2414-2425.
- FANG F, KENNEDY J, MANIKANDAN E, FUTTER J AND MARKWITZ AJCPL. 2012. Morphology and characterization of TiO₂ nanoparticles synthesized by arc discharge. 521: 86-90.
- FRIES R AND SIMKO M. 2012. (Nano-)Titanium dioxide (Part I): Basics, Production, Applications.
- HAIMI S, GORIANC G, MOIMAS L, LINDROOS B, HUHTALA H, RÄTY S, KUOKKANEN H, SÁNDOR GK, SCHMID C AND MIETTINEN SJAB. 2009. Characterization of zinc-releasing three-dimensional bioactive glass scaffolds and their effect on human adipose stem cell proliferation and osteogenic differentiation. 5: 3122-3131.
- HENCH LLJJOMSMIM. 2006. The story of Bioglass®. 17: 967-978.
- HENCH LLJJOTECS. 2009. Genetic design of bioactive glass. 29: 1257-1265.

- HOPPE A, GÜLDAL NS AND BOCCACCINI ARJB. 2011. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. 32: 2757-2774.
- HOTCHKISS KM, REDDY GB, HYZY SL, SCHWARTZ Z, BOYAN BD AND OLIVARES-NAVARRETE R. 2016. Titanium surface characteristics, including topography and wettability, alter macrophage activation. *Acta biomaterialia* 31: 425-434.
- IGNASIAK K AND MAXWELL A. 2017. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. *BMC research notes* 10: 428.
- JONES JRJAB. 2013. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. 9: 4457-4486.
- KAVIYARASU K, GEETHA N, KANIMOZHI K, MARIA MAGDALANE C, SIVARANJANI S, AYESHAMARIAM A, KENNEDY J AND MAAZA M. 2017. In vitro cytotoxicity effect and antibacterial performance of human lung epithelial cells A549 activity of Zinc oxide doped TiO(2) nanocrystals: Investigation of bio-medical application by chemical method. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications* 74: 325-333.
- KOKUBO T, KIM H-M AND KAWASHITA MJB. 2003. Novel bioactive materials with different mechanical properties. 24: 2161-2175.
- KOKUBO T AND TAKADAMA HJB. 2006. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? 27: 2907-2915.
- LAPPAS CM. 2015. The immunomodulatory effects of titanium dioxide and silver nanoparticles. *Food and Chemical Toxicology* 85: 78-83.
- LAQUERRIERE P, GRANDJEAN-LAQUERRIERE A, JALLOT E, BALOSSIER G, FRAYSSINET P AND GUENOUNOU M. 2003. Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes in vitro. *Biomaterials* 24: 2739-2747.
- LIAO H, WURTZ T AND LI JJJOBMR. 1999. Influence of titanium ion on mineral formation and properties of osteoid nodules in rat calvaria cultures. 47: 220-227.
- MAGUIRE R, DUGGAN O AND KAVANAGH K. 2016. Evaluation of *Galleria mellonella* larvae as an in vivo model for assessing the relative toxicity of food preservative agents. *Cell biology and toxicology* 32: 209-216.
- MANTOVANI A, SICA A, SOZZANI S, ALLAVENA P, VECCHI A AND LOCATI M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25: 677-686.
- MARIANI E, LISIGNOLI G, BORZÌ RM AND PULSATELLI L. 2019. Biomaterials: Foreign Bodies or Tuners for the Immune Response? *International journal of molecular sciences* 20.
- PIATEK M, SHEEHAN G AND KAVANAGH K. 2021. *Galleria mellonella*: The Versatile Host for Drug Discovery, In Vivo Toxicity Testing and Characterising Host-Pathogen Interactions. *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 10.
- PLACEK LM, KEENAN TJ, LI Y, YATONGCHAI C, PRADHAN D, BOYD D, MELLOTT NP AND WREN AW. 2016. Investigating the effect of TiO(2) on the structure and

- biocompatibility of bioactive glass. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 104: 1703-1712.
- SHI J, HAN S, ZHANG J, LIU Y, CHEN Z AND JIA G. 2022. Advances in genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in vivo and in vitro. *NanoImpact* 25: 100377.
- SKOCAJ M, FILIPIC M, PETKOVIC J AND NOVAK S. 2011. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? *Radiology and oncology* 45: 227-247.
- SUN ZL, WATAHA JC, HANKS CT, JOBMRAO, JOTSFB AND BIOMATERIALS TJSF. 1997. Effects of metal ions on osteoblast-like cell metabolism and differentiation. 34: 29-37.
- SYMONS JA, YOUNG PR AND DUFF GW. 1995. Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 beta precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist. 92: 1714-1718.
- WANG J ET AL. 2007. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicology letters* 168: 176-185.
- WANG JY, WICKLUND BH, GUSTILO RB AND TSUKAYAMA DTJB. 1996. Titanium, chromium and cobalt ions modulate the release of bone-associated cytokines by human monocytes/macrophages in vitro. 17: 2233-2240.
- WREN A, BOYD D AND TOWLER MR, JJOMSMIM. 2008. The processing, mechanical properties and bioactivity of strontium based glass polyalkenoate cements. 19: 1737-1743.
- WREN A, CUMMINS N, LAFFIR F, HUDSON S AND TOWLER MR, JJOMSMIM. 2011a. The bioactivity and ion release of titanium-containing glass polyalkenoate cements for medical applications. 22: 19-28.
- WREN A, LAFFIR F, KIDARI A AND TOWLER MR, JJON-CS. 2011b. The structural role of titanium in Ca-Sr-Zn-Si/Ti glasses for medical applications. 357: 1021-1026.
- ZE X ET AL. 2016. TiO₂ nanoparticle-induced neurotoxicity may be involved in dysfunction of glutamate metabolism and its receptor expression in mice. 31: 655-662.
- ZIENTAL D, CZARCZYNSKA-GOSLINSKA B, MLYNARCZYK DT, GLOWACKA-SOBOTTA A, STANISZ B, GOSLINSKI T AND SOBOTTA L. 2020. Titanium Dioxide Nanoparticles: Prospects and Applications in Medicine. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 10.

7 APÊNDICE B - LISTA PARTICIPAÇÃO DE COAUTORES

Tatiana Lamounier Silva¹, ID do ORCID: 0000-0002-0372-6208

Camilla Beatriz da Silva Melo¹, ID do ORCID: 0000-0002-4387-2189

Anielle Christine Almeida Silva², ID do ORCID: 0000-0002-5274-156X

Sanívia Aparecida de Lima Pereira³; ID do ORCID:0000-0002-0293-2587

Virmondes Rodrigues Junior¹, ORCID: 0000-0001-8706-4223

Carlo José Freire Oliveira¹, ID do ORCID: 0000-0003-2211-7333

Marcos Vinicius da Silva¹; ID do ORCID: 0000-0002-2966-7621

Rodrigo César Rosa¹, ID do ORCID:0000-0003-3157-0826

1 Institute of Biological and Natural Sciences, UFTM - Federal University of Triângulo Mineiro, Rua Vigário Carlos, 100, CEP: 38025-350, Abadia, Uberaba, MG, Brazil.

2 Institute of Biological and Natural Sciences, UFTM - Federal University of Triângulo Mineiro, Rua Vigário Carlos, 100, CEP: 38025-350, Abadia, Uberaba, MG, Brazil.

3 Laboratory of New Nanostructured and Functional Materials, Physics Institute, Federal University of Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, s/n, CEP: 57072-900, Tabuleiro do Martins, Maceió, Al, Brazil.

3 Laboratory of Cell and Molecular Biology, UNIUBE - University of Uberaba, Uberaba, MG, Brazil / Cefores, UFTM - Federal University of Triângulo Mineiro, Av. Getúlio Guaritá, 159, CEP: 38025-440, Abadia, Uberaba, MG, Brazil.

8 ANEXO B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO



Nanostructured Bioglass with TiO₂ Nanoparticles: Assessing Biocompatibility and Immunomodulation

Journal:	<i>Anais da Academia Brasileira de Ciências</i>
Manuscript ID	AABC-2024-0762
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	11-Jul-2024
Complete List of Authors:	Silva, Tatiana; Universidade Federal do Triangulo Mineiro, Instituto de Ciências Biológicas e Naturais Silva, Camilla; Universidade Federal do Triangulo Mineiro, Instituto de Ciências Biológicas e Naturais Silva, Anielle; Universidade Federal de Alagoas, Departamento de Física Pereira, Sanívia; Universidade Federal do Triângulo Mineiro Faculdade de Medicina, CEFORES; 66141583687 Rodrigues Jr, Virmondes; UFTM Freire Oliveira, Carlo Jose; Universidade Federal do Triangulo Mineiro, Microbiologia, Imunologia e Parasitologia Vinicius, Marcos; Universidade Federal do Triangulo Mineiro, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology Rosa, Rodrigo César; Universidade Federal do Triangulo Mineiro Faculdade de Medicina, Department of Structural Biology
Keyword:	Cytotoxicity, nanotechnology, bone regeneration., Galleria mellonella
Classifications:	Health Sciences