# UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA CENTRO UNIVERSITÁRIO ESTADUAL DA ZONA OESTE PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA TRANSLACIONAL

VERONICA DA SILVA FERREIRA

# POTENCIAL ANTITUMORAL E MECANISMO DE INDUÇÃO DE CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS A BASE DE PRATA PRODUZIDAS POR ROTA VERDE

DUQUE DE CAXIAS 2019

# VERONICA DA SILVA FERREIRA

# POTENCIAL ANTITUMORAL E MECANISMO DE INDUÇÃO DE CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS A BASE DE PRATA PRODUZIDAS POR ROTA VERDE

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Biomedicina Translacional - Biotrans, Universidade do Grande Rio - Unigranrio, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Inmetro, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - Uezo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biomedicina.

Orientador: Dr. Celso Sant'Anna de Barbosa Filho Co-orientadores: Dr. Wanderley de Souza e Dr.<sup>a</sup> Elaine Del Nery

# DUQUE DE CAXIAS 2019

## CATALOGAÇÃO NA FONTE UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

F383p	Ferreira, Verônica da Silva.
	Potencial antitumoral e mecanismo de indução de citotoxicidade de nanopartículas a base de prata produzidas por rota verde / Verônica da Silva Ferreira. – Duque de Caxias, 2019.
	116 f. : il. ; 30 cm.
	Tese (Doutorado em Biomedicina Translacional) – Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy", Escola de Ciências da Saúde, 2019. "Orientador: Dr. Celso Sant'Anna de Barbosa Filho Co-orientadores: Dr. Wanderley de Souza Dr.ª Elaine Del Nery". Referências: f. 82-101.
	<ol> <li>Biomedicina. 2. Nanotecnologia. 3. Neoplasias. 4. Citotoxicidade. 5.</li> <li>Anticorpos antineoplásicos. I. Barbosa Filho, Celso Sant'Anna de. II. Souza, Wanderley de. III. Nery, Elaine Del. IV. Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy. V. Título.</li> </ol>
	CDD – 610.28

# VERONICA DA SILVA FERREIRA

# POTENCIAL ANTITUMORAL E MECANISMO DE INDUÇÃO DE CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS A BASE DE PRATA PRODUZIDAS POR ROTA VERDE

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Biomedicina Translacional - Biotrans, Universidade do Grande Rio - Unigranrio, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Inmetro, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - Uezo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biomedicina.

## COMISSÃO JULGADORA

Dr. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho Inmetro/BIOTRANS (Presidente)

> Dr. Sérgio Henrique Seabra UEZO/BIOTRANS

Dr. José Mauro Granjeiro Inmetro/BIOTRANS

Dr. Kildare Rocha de Miranda UFRJ

Dr. Luis Mauricio Trambaioli da Rocha e Lima UFRJ

#### Agradecimentos

A Deus que em todos os momentos esteve comigo e permitiu que eu chegasse até aqui.

Ao meu orientador Celso Sant'Anna, com quem venho trabalhando desde 2011, agradeço pela paciência, pelo apoio que recebi todos esses anos, por toda dedicação em buscar recursos para nossos projetos e por ter me encorajado a superar cada obstáculo que apareceu pelo caminho.

Ao meu coorientador, o professor Wanderley de Souza e a todos os professores do programa Biotrans, em especial ao professor Sergian Vianna, que me orientou na disciplina de estágio em docência e muito contribuiu para meu desenvolvimento profissional.

Aos meus colegas de grupo Chayenne, Nathalia, Mateus, Yuri, Michele, Renato e Renata pelas contribuições técnicas, discussões científicas e pelo companheirismo.

A todos os colegas do prédio 47, pela companhia nos almoços, pelas comemorações e por tornar meus dias melhores e mais leves, em especial ao meu amigo Lucas Marianno que já me acompanha desde a graduação e ao Flávio, que me ensinou pacientemente diversas técnicas.

Às doutoras Emile Barrias e Ana Paula Gadelha, que sempre colaboraram com meu trabalho.

À doutora Elaine Del Nery, minha coorientadora no Institut Curie, agradeço a oportunidade e por todo apoio recebi para a realização do meu estágio de doutorado sanduíche.

À equipe do Labio, especialmente ao professor Leonardo Boldrini e à técnica Priscila Grion por fornecerem linhagens celulares e pelo apoio técnico.

Aos colegas do Institut Curie: Adèle, Aurienne, Bérengère, Bruno, Kévin, Maxime e Sara Magri pela acolhida e por todo o apoio técnico e científico. *Je voudrais aussi remercier Dominique, la meilleure et plus généreuse institutrice de français que j'ai connu.* 

À Annick por me receber e acolher tão bem em Paris.

Aos meus amigos e familiares por sempre apoiarem a minha carreira (mesmo sem entender muito bem), em especial à minha mãe que sempre fez todo o possível para me ajudar a seguir em busca dos meus sonhos.

Ao meu namorado Eduardo, pela compreensão, incentivo e suporte.

A FAPERJ, CNPq, Inmetro e Institut Curie pelo suporte financeiro ao projeto e à CAPES pelas bolsas no país e no exterior (bolsista da Capes/PDSE/Processo nº 88881.134152/2016-01).

"Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade."

### Marie Curie

"Filho, aceite a instrução desde a juventude, e até a velhice você encontrará a sabedoria. Como um lavrador ou semeador, aproxime-se dela e espere por seus frutos saborosos. Por um pouco de tempo você terá que trabalhar para cultivá-la, mas logo comerá dos seus frutos."

Eclesiástico (6:18-19)

#### Resumo

A maioria dos tratamentos de câncer incluem cirurgias, radioterapia e quimioterapia. Entretanto, além dos efeitos colaterais, muitos tipos de tumores são resistentes à radioterapia e aos agentes quimioterápicos. Neste contexto, tratamentos antitumorais mais eficientes vêm sendo buscados. Dentre as novas estratégias terapêuticas, a utilização de nanopartículas (NPs) a base de prata tem se destacado devido a seus múltiplos mecanismos de ação. As nanopartículas de cloreto de prata (AgCl-NPs) e de Prata/Cloreto de Prata (Ag/AgCl-NPS) podem ser produzidas biologicamente, são estáveis em solução e capazes de liberar íons Ag+, entretanto a atividade antitumoral destas NPs ainda foi pouco explorada. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antitumoral e identificar os mecanismos de indução de citotoxicidade de AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs produzidas por rota verde. Para avaliar o potencial antitumoral das nanopartículas foram utilizadas como modelo as linhagens tumorais BT-474 (adenocarcinoma mamário), MDAMB436 (adenocarcinoma mamário triplo negativo) e A673 (sarcoma de Ewing), que foram tratadas com 0 - 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs ou 0 -40 µg/mL de AgCl-NPs. A avaliação de seletividade foi realizada usando como modelo as células não tumorais RPE-1 (epitélio pigmentado da retina). Após a exposição às NPs, as células RPE-1 apresentaram reduções menores que 50% na proliferação e 11% na viabilidade, menos de 4% de apoptose na população e não foram encontrados danos lisossomais, mudanças na produção de ROS, na polimerização de microfilamentos, no potencial de membrana mitocondrial ou na área celular. As linhagens tumorais BT-474, MDA-MB-436 e A673 tiveram seus níveis de proliferação notavelmente diminuídos e suas viabilidades reduzidas em 64,19, 46,19 e 99,17%, e 98,36, 82,29 e 92,51%, quando tratadas com AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs, respectivamente. Nestas células os tratamentos induziram ainda aumento significativo na produção celular de ROS e perda no potencial de membrana mitocondrial que culminaram no aumento do percentual de apoptose na população. As células da linhagem BT-474 apresentaram ainda perda da acidificação lisossomal quando tratadas com as maiores concentrações de nanopartículas (40 e 12,5 µg/ml de AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs, respectivamente) e redução de 85% na polimerização do citoesqueleto de actina quando tratada com Ag/AgCl-NPs. Enquanto a linhagem A673 apresentou dano lisossomal e redução de cerca de 23% na área da célula quando tratada com 40 µg/mL AgCl-NPs. Os resultados demonstraram ainda que a exposição à Ag/AgCl-NPs induz alterações na morfologia da superfície celular de HFF-1 (Fibroblastos de prepúcio humano), que passam a apresentar maior número de protusões de membrana. Em conclusão, os resultados apontaram que AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs possuem ação citotóxica mediada pela produção de ROS e induzem morte por apoptose por via mitocondrial ou lisossomal, dependendo do tipo celular. As NPs demonstraram promissora atividade antitumoral com reduzidos efeitos contra células não tumorais, o que aponta para uma futura aplicação clínica.

#### Abstract

Cancer therapy includes surgeries, radiotherapy and chemotherapy. However, tumors are resistant to radiotherapy and chemotherapics. In this context, efficient antitumor treatments are necessary. The use of silver-based nanoparticles (NPs) is promising in combating cancer cells due to their multiple mechanisms of action. Silver chloride (AgCl-NPs) and silver/silver chloride (Ag/AgCl-NPs) nanoparticles can be biologically produced, are stable in solution and able to release Ag+ ions, however, their antitumor activity has been little explored. This work aimed to evaluate the antitumor potential and to identify the cytotoxicity mechanisms of AgCl-NPs and Ag/AgCl-NPs produced via green route. For this, the tumor cell lines BT-474 (Mammary Adenocarcinoma), MDAMB436 (Triple Negative Mammary Adenocarcinoma) and A673 (Ewing's Sarcoma) were used as models. Cells were treated with 0 - 40 µg/ml AgCl-NPs or 0 - 12.5 µg/mL Ag/AgCl-NPs. Selectivity evaluation was performed using RPE-1 non-tumor cells (Retinal Pigmented Epithelium). After administration of NPs, RPE-1 reduced less than 50% of cells density and viability in 11%. In addition, less than 4% of apoptosis in the population, as well as no lysosomal damage, changes in ROS production, microfilaments polymerization, mitochondrial membrane potential or cell area were found. Tumor cell lines BT-474, MDA-MB-436 and A673 had their proliferation levels remarkably decreased and their viability reduced by 64.19, 46.19 and 99.17%, and 98.36, 82.29 and 92, 51% when treated with AgCl-NPs and Ag/AgCl-NPs, respectively. In these cells the treatments induced a significant increase in ROS cellular production and loss in the mitochondrial membrane potential that culminated in the increase in percentage of apoptosis in the population. In BT-474 cells the lysosomal acidification decreased when treated with the higher concentrations of nanoparticles (40 µg/ml AgCl-NPs and 12.5 µg/ml Ag/AgCl-NPs) and showed an 85% reduction in microfilaments polymerization when treated with Ag/AgCl-NPs. A673 cells presented lysosomal damage and a reduction of approximately 23% in the cell area when treated with 40 µg/mL AgCl-NPs. The exposure to Ag/AgCl-NPs induced membrane protrusions in HFF-1 (Human Foreskin Fibroblasts). In conclusion, the results indicated that AgCl-NPs and Ag/AgCl-NPs have cytotoxic action mediated by ROS production and induce cell death by apoptosis via mitochondrial or lysosomal route, according to the cell type. The NPs demonstrated promising antitumor activity with reduced effects against non-tumor cells, indicating clinical applications for cancer therapy.

# Lista de Figuras

Figura 1: Desenho esquemático das abordagens Top-down e Bottom-up para a síntese de
nanomateriais
Figura 2: Ensaio de proliferação de células humanas tumorais e não tumorais
Figura 3: Imagens representativas do ensaio proliferação de células humanas tumorais (BT-
474, MDA-MB-436 e A673) e não tumorais (RPE-1)28
Figura 4: Ensaio de proliferação de células humanas tumorais e não tumorais30
Figura 5: Imagens representativas do ensaio proliferação de células humanas tumorais (BT-
474, MDA-MB-436 e A673) e não tumorais (RPE-1)30
Figura 6: Compactação Nuclear de células humanas tumorais e não tumorais
Figura 7: Compactação Nuclear de células humanas tumorais e não tumorais37
Figura 8: Ensaio de viabilidade de células humanas tumorais e não tumorais
Figura 9: Imagens representativas do ensaio viabilidade de células humanas tumorais (BT-
474, MDA-MB-436 e A673) e não tumorais (RPE-1)40
Figura 10: Ensaio de viabilidade de células humanas tumorais e não tumorais42
Figura 11: Imagens representativas do ensaio viabilidade de células humanas tumorais (BT-
474, MDA-MB-436 e A673) e não tumorais (RPE-1)43
Figura 12: Avaliação do percentual de células apoptóticas em linhagens tumorais e não
tumorais45
Figura 13: Avaliação do percentual de células apoptóticas em linhagens tumorais e não
tumorais47
Figura 14: Avaliação da presença de ROS em linhagens tumorais e não tumorais49
Figura 15: Avaliação da presença de ROS em linhagens tumorais e não tumorais50
Figura 16: Imagens de representativas da linhagem RPE-1 expostas por 48h a concentrações
entre 0 e 40 µg/mL de AgCl-NPs52
Figura 17: Imagens de representativas da linhagem RPE-1 expostas por 48h a concentrações
entre 0 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs53
Figura 18: Imagens de representativas da linhagem tumoral BT-474 expostas por 48h a
concentrações entre 0 e 40 µg/mL de AgCl-NPs54
Figura 19: Imagens de representativas da linhagem tumoral BT-474 expostas por 48h a
concentrações entre 0 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs55

Figura 20: Imagens de representativas da linhagem tumoral MDA-MB-436 expostas por 48h a
concentrações entre 0 e 40 µg/mL de AgCl-NPs56
Figura 21: Imagens de representativas da linhagem tumoral MDA-MB-436 expostas por 48h a
concentrações entre 0 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs57
Figura 22: Imagens de representativas da linhagem tumoral A673 expostas por 48h a
concentrações entre 0 e 40 µg/mL de AgCl-NPs
Figura 23: Imagens de representativas da linhagem tumoral A673 expostas por 48h a
concentrações entre 0 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs
Figura 24: Avaliação da intensidade de fluorescência de lisossomos em linhagens tumorais e
não tumorais61
Figura 25: Avaliação da intensidade de fluorescência de lisossomos em linhagens tumorais e
não tumorais61
Figura 26: Avaliação do percentual de células que perderam o potencial de membrana
mitocondrial63
Figura 27: Avaliação do percentual de células que perderam o potencial de membrana
mitocondrial
Figura 28: Avaliação da intensidade de fluorescência de microfilamentos de actina de
linhagens tumorais e não tumorais65
Figura 29: Avaliação da intensidade de fluorescência de microfilamentos de actina de
linhagens tumorais e não tumorais65
Figura 30: Avaliação da área celular de linhagens tumorais e não tumorais
Figura 31: Avaliação da área celular de linhagens tumorais e não tumorais67
Figura 32: Ensaio de viabilidade de células humanas tumorais e não tumorais70
Figura 33: Microscopia eletrônica de varredura71
Figure 24. Migragonnia alatrânica da userra dura

## Lista de Tabelas

### Lista de Abreviaturas

AgCl-NPs: Nanopartículas de Cloreto de Prata Ag/AgCl-NPs: Nanopartículas de Prata/Cloreto de Prata AgNPs: Nanopartículas de Prata AOT: Bis(2-etilhexil) Sulfosuccinato de Sódio AuNPs: Nanopartículas de Ouro BSA: Albumina do Soro Bovino CTAB: Brometo de Cetrimônio DHE: Dihydroethidium DRX: Difração de Raios X EDS: Energia Dispersiva de Raios X EthD-1: Homodímero de etídio-1, do inglês Ethidium homodimer-1 ER: Receptores para estrogênio HR<sup>+</sup>: Positivo para receptores de hormônios HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 HER2<sup>+</sup>: Positivo para Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 HER2-: Negativo para Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 IC<sub>50</sub>: do inglês, *inibitory concentration of 50%*, concentração inibitória de 50% IL-1 $\beta$ : Interleucina-1 $\beta$ MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura OEG: Oligo(etilenoglicol) OMS: Organização Mundial de Saúde PGA: Ácido Poliglicólico PLA: Ácido Polilático PLL: Poli-L-Lisina PR: Receptor de progesterona PVP: Polivinilpirrolidona ROS: Espécies Reativas de Oxigênio SE: Sarcoma de Ewing TMRM: Tetrametilrodamina, do inglês, Tetramethylrhodamine

TNBC: Câncer de mama triplo negativo, do inglês Triple-negative Breast Cancer

UA: Unidade Arbitrária UTEX: Universidade do Texas

## Sumário

1. Introdução1
1.1   Nanociência e nanotecnologia1
1.2 Nanomateriais1
1.3 Nanopartículas metálicas3
1.4 Nanomedicina5
1.5 Nanopartículas de Prata7
1.6 Nanopartículas de cloreto de prata8
1.7 Nanopartículas de prata/cloreto de prata10
1.8 Câncer
1.8.1 Câncer de Mama12
1.8.2 Sarcoma de Ewing14
1.9 Mecanismo de ação de nanopartículas a base de prata16
2. Justificativa
3. Objetivos
3.1 Objetivo geral
3.2 Objetivos específicos
4. Materiais e Métodos
4.1 Cultivo de microalgas e síntese de nanopartículas de Cloreto de Prata20
4.2 Cultivo de leveduras e síntese de nanopartículas de Prata/Cloreto de Prata21
4.3 Avaliação do efeito antitumoral de AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs21
4.3.1 Células
4.3.2 Avaliação do efeito antiproliferativo
4.3.3 Avaliação da viabilidade celular22
4.3.4 Avaliação da ocorrência de apoptose23
4.3.5 Avaliação da produção de ROS23

	4.3.6 Avaliação multiparamétrica de citotoxicidade	.24
	4.4 Avaliação dos efeitos da exposição à Ag/AgClNPs na morfologia de células tumorai	s e
	não tumorais	.24
	4.4.1 Células	.24
	4.4.2 Avaliação da viabilidade celular	.25
	4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	.25
	4.6 Análises estatísticas	.26
5.	Resultados	.26
	5.1 Avaliação da nanotoxicidade e efeito antitumoral de AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs	.26
	5.1.1 Proliferação celular	.26
	5.1.2 Tempo de duplicação e taxa de crescimento	.31
	5.1.3 Compactação nuclear	.34
	5.1.4 Viabilidade celular	.37
	5.1.5 Apoptose	.44
	5.1.6 Produção de ROS	.47
	5.1.7 Avaliação multiparamétrica de citotoxicidade	.50
	5.2 Avaliação dos efeitos da exposição à Ag/AgCl-NPs na morfologia de células tumorai não tumorais	is e .68
	5.2.1 Avaliação da viabilidade celular e determinação da concentração de Ag/AgCl-N para ensaios morfológicos	√Ps .68
	5.2.2 Avaliação dos efeitos da exposição à Ag/AgCl-NPs na superfície celular	.70
6.	Discussão	.72
7.	Conclusões	.81
8.	Referências	.82

#### 1. Introdução

#### 1.1 Nanociência e nanotecnologia

O termo "nano" é uma adaptação de uma palavra grega que significa "anão". Quando utilizado como um prefixo para unidades o termo nano significa 10<sup>-9</sup>. Um nanômetro (nm) é igual a um bilionésimo de um metro, o que corresponde a aproximadamente o comprimento de três átomos (THAKKAR *et al.*, 2010). A nanoescala é referente à escala dos nanômetros em que geralmente os materiais apresentam propriedades diferentes daquelas apresentadas em macroescala (HOCHELLA, 2002). A nanociência é definida como o estudo das propriedades dos materiais em nanoescala com foco principal em propriedades que dependem do tamanho de materiais no estado sólido (GLOTZER, 2015). Nanociência na prática significa estudar nanomateriais, que são materiais como pelo menos uma das dimensões com tamanho menor que 100nm, como por exemplo moléculas grandes, agregados de moléculas, colóides, micelas, polímeros e outras estruturas fabricadas em nanoescala, além de estruturas biológicas como o vírus, o DNA, junções GAP e outras nanoestruturas celulares (WHITESIDES, 2005).

A nanociência ainda não pôde ser descrita matematicamente com uma fórmula geral que compreendesse todo e qualquer material. Porém pode-se dizer que qualquer propriedade de qualquer material pode ser alterada de modo brando ou radical, como uma função das dimensões físicas do material. Sendo que estas alterações nas propriedades do material são em geral observadas somente quando o material é reduzido até atingir a nanoescala. E o tamanho em que estas alterações começam a acontecer pode variar entre diferentes materiais e também com a propriedade em questão (HOCHELLA, 2002).

A nanociência constitui a base para implementação da nanotecnologia que é a capacidade de manipular um objeto com pelo menos uma das dimensões em nanoescala, o que inclui processos de síntese, separação, fusão e deformação destes materiais (GLOTZER, 2015).

#### 1.2 Nanomateriais

Um nanomaterial é material natural, acidental ou intencionalmente produzido, que contenha pelo menos 50% de partículas livres ou agregadas com uma ou mais dimensões em escala nanométrica, ou seja, medindo entre um e cem nanômetros (EUROPEAN COMMISSSION, 2011). Os nanomateriais podem ser naturais ou podem ser produzidos pela ação humana. Dentre os nanomateriais naturais podemos citar uma molécula de DNA que tem

cerca de 2,5 nm de largura, uma proteína que possui aproximadamente 50 nm e um vírus da gripe que mede cerca de 100 nm (ZINICOVSCAIA, 2012). Os nanomateriais produzidos por ação antropogênica podem ser produzidos propositalmente ou não. Dentre aqueles produzidos por meios não intencionais podemos citar nanopartículas que são subprodutos da queima de combustíveis, por exemplo. As nanopartículas produzidas pelo homem intencionalmente são em geral o alvo de processos nanotecnológicos (SCHAMING & REMITA, 2015).

Com relação ao número de dimensões em nanoescala, existem três categorias de nanomateriais: as nanopartículas, os nanotubos e os nanofilmes. As nanopartículas são os objetos que possuem as três dimensões em escala nanométrica, os nanotubos possuem duas das dimensões em nanoescala, enquanto os nanofilmes possuem somente uma das dimensões em nanoescala (SCHAMING & REMITA, 2015).

Os nanomateriais podem ter diferentes composições dependendo da aplicação. Pode ser um nanomaterial inorgânico, orgânico ou híbrido (produzido com material orgânico e inorgânico) (KUMAR & KUMBHAT, 2016). Os nanomateriais inorgânicos podem ser compostos de metais, óxidos de metais, semimetais ou estruturas de carbono, como os nanotubos. Os nanomateriais ou nanoestruturas orgânicas são em geral polímeros ou micelas e podem ser compostos, por exemplo, de gelatina, quitosana ou polímeros sintéticos como o ácido polilático (PLA) e ácido poliglicólico (PGA) (LAI *et al.*, 2014; KUMAR & KUMBHAT, 2016).

A utilização de nanomateriais é mais antiga do que os conceitos de nanociência e nanotecnologia. Há 4000 anos antes de Cristo, alquimistas egípcios ingeriam o "elixir da longa vida" para estimular a mente. Este elixir nada mais era do que uma suspensão de nanopartículas de ouro. A tinta nanquim produzida pelos chineses na idade média também era um exemplo de produto nanotecnológico, uma vez que para a fabricação desta tinta eram utilizadas nanopartículas de carvão (FERREIRA & RANGEL, 2009). No século XVII, os artesões fabricavam vitrais coloridos para as igrejas medievais. Estas cores eram obtidas a partir da mistura de nanopartículas de ouro ao vidro e dependendo do tamanho das nanopartículas de ouro, o vidro podia ganhar diferentes cores (ALVES, 2010). Durante a Primeira Guerra Mundial, compostos de prata foram utilizadas para a prevenção de infecções (VARNER *et al.*, 2010).

#### 1.3 Nanopartículas metálicas

Muitos metais são capazes de formar nanopartículas, como a prata, o outro e o cobre (EDMUNDSON *et al.*, 2014). Devido a sua aumentada área de superfície, estas nanoestruturas de metal possuem propriedades ópticas, químicas e elétricas que dependem de seu tamanho e diferem do seu material homólogo em escala macro (KRUMOV *et al.*, 2009; VITHIYA & SEN, 2011). Um dos aspectos mais interessantes é que em nanoescala, muitos metais como o ouro e a prata, possuem forte absorção na região visível do espectro, exibindo cores diferentes dos materiais em grande escala, como o amarelo para a prata e o bordô/roxo para nanopartículas esféricas de ouro (ZHANG & NOGUEZ, 2008). Esta absorção é atribuída à oscilação coletiva de elétrons em resposta ao campo elétrico da radiação eletromagnética de luz, denominada ressonância plasmônica de superfície, em parte porque cargas são deslocadas de modo transiente na superfície da partícula durante a oscilação de elétrons (ZHANG & NOGUEZ, 2008).

A síntese de nanopartículas inorgânicas pode ser feita por duas diferentes abordagens: a "*bottom-up*" ou a "*Top-down*" (Figura 1). Na abordagem *bottom-up* os elementos que compõe o nanomaterial se unem para formá-lo, ou seja, consiste na construção átomo-aátomo ou molécula-por-molécula (THAKAR *et al.*, 2010). Esta abordagem pode ser feita por diversas técnicas como a síntese química, nanoimpressão ou por auto-agregação ("*Selfassembly*"). Na abordagem *Top-down* o nanomaterial é produzido a partir do material em maior escala (micro ou macro), que é então reduzido fisicamente ou quimicamente até atingir a nanoescala (BHUSHAN, 2016).



Figura 1: Desenho esquemático das abordagens Top-down e Bottom-up para a síntese de nanomateriais.

Nanopartículas metálicas podem ser produzidas por síntese química, física ou biológica (VITHIYA & SEN, 2011). Para a síntese física podem ser utilizados métodos como atrito ou pirólise. No método de atrito, partículas são moídas até serem reduzidas de tamanho, enquanto o método de pirólise utiliza um precursor orgânico que é queimado sob alta pressão. Estes métodos apresentam baixa produtividade e alto custo, além de apresentarem grande consumo de energia (THAKKAR *et al.*, 2010). A síntese química geralmente é feita em meio líquido contendo diversos reagentes, como agentes redutores e estabilizantes. O método químico é de baixo custo e apresenta boa produtividade, no entanto, as suas desvantagens incluem a contaminação de precursores químicos e geração de subprodutos tóxicos (THAKKAR *et al.*, 2010), limitando seu uso em aplicações biomédicas.

Métodos biológicos de síntese de nanopartículas são promissores, pois são conduzidos em pH, temperatura e pressões fisiológicos, possuem baixo custo e não produzem resíduos tóxicos (VITHIYA & SEM, 2011). Alguns microrganismos possuem vias metabólicas capazes de sintetizar de forma reprodutível nanopartículas com tamanhos e estruturas bem definidos, solúveis em água e com propriedades biocompatíveis, o que é interessante para muitas aplicações no campo da medicina e farmacologia (KRUMOV et al., 2009). A síntese de nanopartículas por bactérias e outros microrganismos, é um mecanismo de defesa contra a toxicidade de certos íons metálicos presentes no meio, já que juntando os íons em nanopartículas, a concentração destes no meio é reduzida (QUESTER et al. 2013). Nos microrganismos, a síntese de NPs pode ocorrer tanto no meio intracelular quanto extracelular (VITHIYA e SEM, 2011). Foi postulado que microrganismos capazes de sintetizar nanopartículas secretam enzimas que são responsáveis pela redução de íons metálicos, no entanto, o mecanismo bioquímico de formação de nanopartículas ainda precisa ser esclarecido (ZINICOVSCAIA, 2012). A síntese de nanopartículas metálicas utilizando vegetais também se apresenta como promissora devido à grande biocompatibilidade e ao fato de não serem patogênicos ao homem. Métodos de síntese utilizando frutas, flores, sementes e extratos de folhas, cascas e raízes de algumas plantas terrestres e aquáticas já foram testados com sucesso e esta produção foi atribuída a enzimas e também a algumas outras moléculas presentes nos vegetais, como por exemplo os flavonoides, polifenóis, terpenóides (AHMAD et al., 2019). Na síntese biológica, alguns fatores como o pH, temperatura de síntese, tempo de incubação e concentração de metais podem ser modificados, levando a alterações na distribuição de tamanhos, formato e cristalinidade das nanopartículas produzidas (ZINICOVSCAIA, 2012).

Diversos tipos de nanopartículas já foram sintetizados utilizando plantas, bactérias e fungos, como por exemplo, nanopartículas de ouro (JAYASEELAN *et al.*, 2013), cobre (LEE *et al.*, 2013), óxido de ferro (MAHDAVI *et al.*, 2013), prata (SINGH e RAJA 2011), platina (SYED & AHMAD, 2012), dentre outras. Microalgas, no entanto, foram pouco estudadas para este propósito. Alguns trabalhos disponíveis na literatura reportam a bioprodução de nanopartículas de ouro (SHAKIBAIE *et al.*, 2010), prata (MOHSENIAZAR *et al.*, 2011) e bimetálicas de ouro e prata (GOVINDARAJU *et al.*, 2008) e de cloreto de prata (FERREIRA *et al.*, 2017) por algumas espécies de microalgas. A biossíntese de nanopartículas metálicas, já foi demonstrada também utilizando alguns vírus, como o Vírus do Mosaico do Tabaco (TMV), que foi demonstrado promissor na produção de nanopartícula de óxido de ferro (AHMAD *et al.*, 2019).

#### 1.4 Nanomedicina

A nanomedicina nasceu no ano de 2002 quando o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América (NIH) anunciou um programa de nanociência e nanotecnologia na área médica. A Nanomedicina tem como objetivos tratar, diagnosticar e prevenir doenças e injúrias, aliviar dores, preservar e melhorar a vida humana através da aplicação da nanotecnologia à medicina (FREITAS JR., 2005).

Nanomateriais utilizados na nanomedicina incluem lipossomos, micelas, emulsões, dendrímeros, nanopartículas metálicas e poliméricas, nanocristais, nanofibras, nanoconstruídos poliméricos e outros materiais em nanoescala que podem atuar por exemplo no diagnóstico, carreamento e liberação controlada de drogas e até mesmo como nanomedicamentos, que em geral possuem maior eficácia em relação à medicamentos convencionais (MOGHIMI *et al.*, 2005; CHOI & HAN 2018).

Nanopartículas são componentes centrais da nanociência e nanotecnologia, portanto também tem importante papel na nanomedicina (LATEEF *et al.*, 2018). Nanopartículas podem ser utilizadas como carreadores para drogas abrindo diversas possibilidades para a síntese e utilização de drogas, inclusive para o tratamento de câncer, de filmes nanoestruturados e arcabouços para implantes de tecidos (KRUMOV *et al.*, 2009). As nanopartículas de ouro, por exemplo, podem ser funcionalizadas para uso em testes diagnósticos como o teste de gravidez em que estas partículas são conjugadas com anticorpos contra o hormônio  $\beta$ -HCG (SCHAMING & REMITA, 2015). Nanopartículas de ouro podem

ainda ser utilizadas por exemplo em terapias fotodinâmicas, terapias em que a nanopartícula é utilizada como um agente fotossensibilizante e exposta a um laser levando a necrose ou apoptose de células próximas, esta terapia pode ser utilizada por exemplo em tratamentos de tumores (ELAHI et al., 2018). Outro exemplo são as nanopartículas magnéticas, podem ser utilizadas como contraste para exames de ressonância magnética, podem ser submetidas a campos magnéticos para serem carreadas para locais específicos e ainda podem ser campos magnéticos de corrente alternada que induzem o aquecimento das partículas, possibilitando que elas sejam utilizadas em tratamentos de hipertermia contra tumores localizados (STAFFORD et al., 2018). Algumas nanopartículas metálicas possuem atividade antimicrobiana, podendo ser utilizadas na fabricação de tecidos, embalagens para alimentos e medicamentos. Por exemplo, já foram demonstradas a ação antibacteriana de nanopartículas de prata (PANÁCEK et al., 2006), de cloreto de prata (GOPINATH et al., 2013; FERREIRA et al., 2017), prata/cloreto de prata (EUGENIO et al., 2016), de cobre (RUPARELIA et al., 2008) e ouro (GEETHALAKSHMI & SARADA, 2013). Nanopartículas de prata (JO et al., 2009; MUÑOZ et al., 2014), cobre (WEI et al., 2010) e ouro (GEETHALAKSHMI & SARADA, 2013) também possuem ação antifúngica comprovada. Poucos trabalhos avaliaram o potencial de nanopartículas metálicas contra protozoários parasitas, no entanto já se sabe, por exemplo, que nanopartículas de prata possuem bom efeito proliferativo contra Leishmanias (ALLAHVERDIYEV et al., 2011). Nanopartículas metálicas foram também demonstradas eficazes como agentes antivirais (GAIKWAD et al., 2013).

Nanopartículas metálicas já foram avaliadas como nanomedicamentos anticoagulantes, demonstrando bons resultados, sendo promissores candidatos para substituir medicamentos anticoagulantes e trombolíticos que tem baixa meia-vida, são caros e possuem alguns efeitos colaterais hemorrágicos (LATEEF *et al.*, 2018).

Alguns trabalhos mostram ainda que algumas nanopartículas metálicas apresentam ação anticancerígena, por exemplo, nanopartículas de prata possuem efeito antiproliferativo em células cancerígenas da linhagem THP-1 (Leucemia mielóide aguda) (THOMBRE *et al.*, 2013) e nanopartículas de cobre possuem efeito citotóxico contra células de câncer de pulmão da linhagem A549 (VALODKAR *et al.*, 2011). As nanopartículas de ouro possuem a capacidade de melhorar o efeito de outras drogas contra células cancerígenas (CHEN *et al.*, 2007) e ainda aumentar o efeito da radioterapia contra o câncer *in vivo* (HAINFELD *et al.* 2004).

#### 1.5 Nanopartículas de Prata

A síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) já foi demonstrada por diversos métodos químicos, por exemplo, utilizando polióis (KIM *et al.*, 2006), utilizando ácido ascórbico ou etanol e surfactantes (MARZÁN & TOURIÑO, 1996; AL-THABAITI *et al.*, 2008) e eletroquímica (NASRETDINOVA *et al.*, 2015). Também por métodos físicos, como a irradiação de elétrons (BOGLE *et al.*, 2006) e biológicos utilizando vegetais (LOGESWARI *et al.*, 2016), algas marinhas (EDISON *et al.*, 2016), bactérias (SHANTHI *et al.*, 2016), fungos (AMERASAN *et al.*, 2016) e microalgas (JENA *et al.*, 2015).

AgNPs possuem efeito antibacteriano contra bactérias Gram-positivas e negativas (GURUNATHAN *et al.*, 2014). São também capazes de inibir a formação de biofilmes bacterianos, como demonstrado por GURUNATHAN *et al.* (2015) que utilizaram AgNPs para inibir a formação de biofilmes de *Helicobacter Pylori* e *Helicobacter felis*, além disso demonstraram que o tratamento com nanopartículas induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) com consequente fragmentação do DNA e morte celular. AgNPs podem ainda ter efeito sinérgico com antibióticos por meio de alterações na permeabilidade membranar e danos na parede celular, que facilitariam a entrada do antibiótico nas células, e inibição da atividade de enzimas, incluindo aquelas que degradam os antibióticos (SMEKALOVA *et al.*, 2016). PANÁCEKAT *et al.* (2016) demonstraram que AgNPs são capazes até mesmo de restaurar a atividade de antibióticos inativos contra bactérias multirresistentes, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de  $\beta$ -lactamase e carbapenemase.

AgNPs também possuem atividade antifúngica (MUÑOZ *et al.*, 2014). XUE *et al.* (2016) demonstrou que nanopartículas de prata sintetizadas pelo fungo *Arthroderma fulvum* possui ação antifúngica contra dez espécies testadas sendo quatro do gênero *Candida* spp., três do gênero *Aspergillus* spp. e outras três do gênero *Fusarium* spp. Além disso, AgNPs foram demonstradas como capazes não só de inibir a formação de biofilme, mas também são eficazes contra biofilmes já formados por *Candida albicans* (LARA *et al.*, 2015).

Alguns trabalhos mostram ainda que nanopartículas de prata possuem atividade antiviral. KHALID *et al.* (2017) demonstrou que AgNPs sintetizadas por três diferentes espécies de microalgas possuem atividade contra o vírus da doença de Newcastle. SUJITHA *et al.* (2015) demonstrou que AgNPs possuem atividade antiviral *in vitro* contra o vírus da dengue (DEN-2), reduzindo de maneira dose-dependente a carga viral de células Vero

infectadas. Nanopartículas de prata possuem também atividade larvicida e pupicida contra o mosquito vetor *Aedes aegypti* (SUJITHA *et al.*, 2015). GOVINDARAJAN e BENELLI (2016) demonstraram também efeito larvicida contra larvas das espécies de mosquitos vetores *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus* e *Culex tritaeniorhynchus* sendo ao mesmo tempo segura para espécies não alvo como *Diplonychus indicus*, *Anisops bouvieri* e *Gambusia affinis*. Enquanto AMERASAN *et al.* (2016) demonstraram o efeito larvicida de AgNPs biossintetizadas por fungos contra larvas e pupas da espécie vetora da malária *Anopheles culicifacies*.

AgNPs apresentam ainda efeito antiparasitário contra *Leishmania tropica* nas formas promastigota e amastigota (ALLAHVERDIYEV *et al.*, 2011), *Giardia lamblia* (SAID *et al.*, 2012) e oocistos de *Cryptosporidium parvum* (CAMERON *et al.*, 2016). GAAFAR *et al.* (2014) demonstrou por meio de experimentos *in vivo* o tratamento com AgNPs foi capaz de reduzir a contagem de taquizoítas de *Toxoplasma gondii* no fígado e baço de camundongos infectados além disso, os taquizoítas encontrados no exudato peritoneal dos animais tratados com AgNPs apresentam perda dos movimentos e deformações na superfície celular.

A atividade antitumoral de AgNPs já foi demonstrada em diversas linhagens tumorais como MCF-7 (adenocarcinoma mamário) (SONKER *et al.*, 2017), MDA-MB-231, (adenocarcinoma mamário), Hela (câncer cervical), KB (carcinoma epitelial oral) (BARUA *et al.*, 2016), HepG-2 (hepatoma) e HTC-116 (câncer de cólon) (GOMAA *et al.*, 2017).

#### 1.6 Nanopartículas de cloreto de prata

Nanopartículas de cloreto de prata (AgCl-NPs) já foram sintetizadas por métodos químicos, físicos e biológicos. A síntese química de AgCl-NPs já foi demonstrada por diferentes métodos como, por exemplo, utilizando surfactantes e cloreto de prata em pó (HUSEIN *et al.*, 2005); pela reação de KCl e AgNO<sub>3</sub> em solventes orgânicos assistida por ultrassom (ABBASI & MORSALI, 2013) e pela reação de AgNO<sub>3</sub> e HCl seguida por tratamento térmico (SIDDIQUI *et al.*, 2013). Estes métodos possuem algumas desvantagens, como a geração de resíduos tóxicos. No caso do método que utiliza surfactantes o custo é mais elevado e ao aplicar o tratamento térmico (altas temperaturas) há um maior gasto energético. A síntese de AgCl-NPs por método físico já foi demonstrada usando ablação a laser em meio líquido (MAHMOOD *et al.*, 2016), este método produz nanopartículas bastante homogêneas quanto ao tamanho, no entanto é caro e pouco produtivo, o que dificulta o seu emprego em larga escala (ZENG *et al.*, 2012).

A síntese biológica de AgCl-NPs foi demonstrada utilizando bactérias como *Klebsiella planticola* (PAULKUMAR *et al.*, 2013a) e *Bacillus subtilis* (PAULKUMAR *et al.*, 2013b), em ambos os casos a biomassa das bactérias foi incubada com nitrato de prata à 37°C, sob agitação por 24h. GOPINATH *et al.*, (2013) demonstrou a síntese de AgCl-NPs por meio da incubação de AgNO<sub>3</sub> com um extrato aquoso de folhas de *Cissus quadrangularis* em uma reação conduzida a temperatura ambiente e protegida da luz. AgCl-NPs já foram produzidas também utilizando extrato de raiz de *Onosma dichroantha* (NEZAMDOOST *et al.*, 2014) ou extrato de *Sargassum plagiophyllum* (DHAS *et al.*, 2014). Em ambos, o extrato vegetal foi incubado com AgNO<sub>3</sub> a temperatura ambiente. Recentemente, nosso grupo demonstrou a síntese de AgCl-NPs a partir do sobrenadante do cultivo de microalgas *Chlorella vulgaris* (FERREIRA *et al.*, 2017) e por bactérias *Bacillus megaterium* (CHARELLI *et al.*, 2018).

Poucos estudos foram feitos no intuito de avaliar as potenciais aplicações biomédicas das AgCl-NPs e a maior parte destes são limitados a avaliações dos efeitos antibacterianos e antifúngicos (PAULKUMAR *et al.*, 2013b; KUMAR *et al.*, 2014).

GOPINATH *et al.* (2013) demonstrou que AgCI-NPs possuem efeito antibacteriano contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogens*, e as Gram-negativas *Escherichia coli* e *Proteus vulgaris*, todas bactérias consideradas patógenos oportunistas. Neste mesmo trabalho foi demonstrado que a concentração inibitória mínima (MIC) de AgCI-NPs foi menor que a do antibiótico Tetraciclina tanto para as bactérias Gram positivas quanto para as Gram negativas. AgCI-NPs induzem alterações morfológicas em bactérias, como demonstrado em estudos feitos em *Escherichia coli*, que devido ao acúmulo de nanopartículas na região periplasmática (região entre as membranas interna e externa de bactérias Gram negativas) sofreu ruptura de membranas e alterações na função celular (DHAS *et al.*, 2014). Nosso grupo obteve resultados semelhantes quando expôs *S. aureus* e *Klebsiella pneumoniae* à AgCI-NPs. Além do pronunciado efeito antiproliferativo, as nanopartículas reduziram de modo dose-dependente a viabilidade das bactérias e as análises ultraestruturais demonstraram que as nanopartículas interagem com a superfície das células e também induzem um arranjo anormal do DNA das bactérias, formando uma estrutura conhecida como "região de baixo peso molecular" (FERREIRA *et al.*, 2017).

A atividade antifúngica de AgCl-NPs foi demonstrada por PAULKUMAR *et al.* (2013b) contra *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*. AgCl-NPs atuam junto com antibióticos, como canamicina e rifampimicina, melhorando seus efeitos contra

bactérias Gram positivas e negativas, e com a anfotericina B, potencializando seus efeitos contra cinco espécies de leveduras do gênero *Candida* (PATRA & BAEK, 2016).

AgCl-NPs apresentam também efeito anti-inflamatório, reduzindo a produção de óxido nítrico e prostaglandinas estimuladas por lipopolissacarídeos em células RAW2647 (KANG *et al.*, 2018). CHARELLI *et al* (2018) demonstraram que AgCl-NPs produzidas por *B. megaterium* induziram simultaneamente aumento na secreção de interleucinas próinflamatórias IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  e da interleucina anti-inflamatória IL-10 em esferoides produzidos a partir de células tronco de tecido adiposo humano.

#### 1.7 Nanopartículas de prata/cloreto de prata

A composição exata das nanopartículas de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl-NPs) ainda não foi claramente descrita, atualmente tem-se duas hipóteses: (1) Ag/AgCl-NPs são nanopartículas hibridas formadas por prata e cloreto de prata e (2) uma solução de Ag/AgCl-NPs, é uma solução onde coexistem as nanopartículas de prata e as de cloreto de prata (DURÁN *et al.*, 2016). Este tipo de nanopartículas podem ser sintetizadas quimicamente (CHEN *et al.*, 2012; SONG *et al.*, 2013) ou biologicamente por fungos filamentosos e leveduriformes, bactérias, plantas, algas e enzimas (revisado por DURÁN *et al.*, 2016).

Assim como as nanopartículas de cloreto de prata, as Ag/AgCl-NPs também não tiveram suas aplicações biomédicas extensamente exploradas e estão limitadas a avaliações principalmente de seus efeitos antibacterianos, antifúngicos e antiproliferativo contra células tumorais, o que pode indicar um potencial antitumoral (BOONTO *et al.*, 2016; DURÁN *et al.*, 2016; CHANKAEW *et al.*, 2018). Por exemplo, nosso grupo demonstrou que Ag/AgCl-NPs biossintetizadas por leveduras possuem atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *K. pneumoniae*, bactérias Gram positiva e negativa, respectivamente (EUGENIO *et al.*, 2016). A atividade antibacteriana de Ag/AgCl-NPs sintetizadas utilizando suco de rabanete foi demonstrada por BOONTO *et al.* (2016) contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e a Gram-negativa *Escherichia coli*.

Segundo DURÁN *et al.* (2016) diversos trabalhos fazem a interpretação incorreta de dados de difração de raios-X de nanopartículas, o que leva à erros na determinação da composição de nanopartículas a base de prata. A difração de raios X é uma importante técnica utilizada no estudo e caracterização de estruturas cristalinas de materiais sólidos, inclusive nanopartículas porque permite identificação da composição já que cada sólido em fase cristalina apresenta um padrão de difração único (SHARMA *et al.*, 2012). Deste modo,

diversos trabalhos publicados com caracterização e avaliação de potenciais aplicações de AgNPs e AgCl-NPs foram na verdade feitos com Ag/AgCl-NPs. Por exemplo, fazendo uma reavaliação dos espectros de raio-X publicados por LONGHI *et al.* (2015), DURÁN *et al.* (2016) concluiu que este trabalho que mostra efeito antifúngico de nanopartículas de prata contra *Candida albicans* foi na verdade feito com Ag/AgCl-NPs.

Nanopartículas de Ag/AgCl produzidas biologicamente utilizando extrato de *Citrus hystrix* tiveram ação antiproliferativa contra células HCT116 e Caco-02, ambas linhagens de tumores colorretais, enquanto fibroblastos humanos não tumorais não sofreram nenhuma alteração significativa no crescimento (CHANKAEW *et al.*, 2018). O efeito antiproliferativo de Ag/AgClNPs contra células tumorais foi demonstrado também pelo nosso grupo em GBM02 (Glioblastoma) onde apresentou efeitos mais pronunciados em comparação astrócitos saudáveis tratados com as mesmas concentrações (EUGENIO *et al.*, 2018). Este trabalho demonstrou ainda que a ação de Ag/AgCl-NPs em altas concentrações tem ação mais eficiente que o quimioterápico atualmente utilizado no tratamento do glioblastoma, a Temozolamida (TMZ) e com reduzidos efeitos sobre astrócitos saudáveis (EUGENIO *et al.*, 2018)

### 1.8 Câncer

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer, também chamado de tumor maligno ou neoplasia, é um nome genérico dado a grande grupo de doenças que pode afetar qualquer parte do corpo. O tumor maligno é caracterizado pela presença uma célula ou mais células que apresentam crescimento descontrolado e em muitos casos possuem capacidade para invadir tecidos e realizar metástase (NAZEEMA & SUGANNYA, 2014). O câncer é atualmente a segunda maior causa de mortes no mundo e estima-se que no ano de 2018 foi causa de 9.6 milhões de mortes no mundo (OMS, 2018).

O câncer é causado pelo acúmulo de mutações genéticas que favoreçam a proliferação celular e que podem ser herdadas, induzidas ou causadas por erros na replicação do DNA (TOMASETTI *et al.*, 2017). De modo que o câncer pode ser causado por uma complexa combinação de fatores genéticos, epigenéticos, ambientais e comportamentais, sendo considerado uma doença multifatorial (VERMA *et al.*, 2004; HAMILTON & WATERS, 2018). Alguns dos fatores de risco ambientais e comportamentais mais comuns incluem o tabagismo, o sobrepeso/obesidade, dietas pobres em vegetais, alcoolismo, doenças infecciosas (como AIDS e hepatite), poluição do ar e exposição a radiações (OMS, 2018).

As neoplasias podem ser classificados de acordo com os tecidos e células de onde se originaram: carcinomas são cânceres derivados de células epiteliais, sarcomas são cânceres derivados de células musculares ou de tecidos conectivos, existem ainda outros tipos de câncer que não se enquadram nestas duas categorias, como os tumores do tecido nervoso e as leucemias e linfomas, que são tumores derivados de células hematopoiéticas. Existem ainda diversas subdivisões em cada classificação, por exemplo um adenocarcinoma é um tumor maligno originado no tecido epitelial, especificamente em uma glândula (ALBERTS *et al.*, 2017).

O tecido neoplásico além das células tumorais, possui outros dois subcompartimentos: o vascular e o intersticial. A vascularização de tecidos tumorais é bastante irregular e compreende áreas de hemorragias e áreas de intensa vascularização, o que provê nutrientes e oxigênio em abundância possibilitando o crescimento rápido das células tumorais. Os vasos sanguíneos de tecidos tumorais possuem membrana basal anormal, deficiência em pericito e células endoteliais altamente proliferativas, o que resulta em uma alta permeabilidade vascular. O compartimento intersticial é formado principalmente por uma rede de fibras de colágeno e elastina, o fluido intersticial e macromoléculas como proteoglicanos e ácido hialurônico. Diferente do interstício de um tecido normal, o compartimento intersticial tumoral não possui uma rede linfática funcional o que mantém alta pressão intersticial, o que leva a um fluxo de líquido intersticial para fora (BRIGGER *et al.*, 2012).

O câncer é atualmente tratado por quimioterapia, radioterapia ou por meio de cirurgias, podendo ainda incluir transplantes (VLASHI & PAJONK, 2015). A estratégia de tratamento é definida de acordo com o tipo de câncer e estágio em que a doença é descoberta. O diagnóstico precoce do câncer aumenta significativamente a chance de sucesso do tratamento (OMS, 2018). Durante o tratamento quimioterápico, a entrega do agente terapêutico no sítio tumoral pode ter alguns problemas advindos de (I) resistência a drogas devido a barreiras fisiológicas, (II) má distribuição ou biotransformação e/ou *clearance* da droga ou (III) resistência a nível celular. A alta pressão do fluido intersticial e a arquitetura vascular podem impedir ou retardar a entrega da droga antitumoral. Além disso, o ambiente ácido do interstício tumoral pode também modificar a superfície da droga impedindo sua entrada nas células (BRIGGER *et al.*, 2012).

### 1.8.1 Câncer de Mama

Câncer de mama é juntamente com os canceres de cólon e de pulmão um dos três mais comuns (HARBECK & GNANT, 2017), sendo entre as mulheres o tipo com maior incidência

e mortalidade (BRAY *et al.*, 2018). A incidência e a mortalidade do câncer de mama têm aumentado na África, América do Sul e Ásia, provavelmente devido a mudanças no estilo de vida e demora no diagnóstico e início da terapia (HARBECK & GNANT, 2017). Já nos Estados Unidos e Europa, a taxa de morte por câncer de mama tem reduzido nos últimos anos, redução que vem sendo atribuída ao diagnóstico precoce (CEDOLINI *et al.*, 2014; DESANTIS *et al.*, 2017). Entretanto, nos Estados Unidos a incidência de câncer *in situ* e invasivo continuam aumentando discretamente, em especial entre mulheres com mais de 50 anos (DESANTIS *et al.*, 2017). Estima-se que uma a cada 8 ou 10 mulheres desenvolverá câncer ao longo da vida (HARBECK & GNANT, 2017). A gravidez tardia, o fato de não ter nenhum filho, obesidade e o uso de hormônios na menopausa são considerados fatores de risco para o câncer de mama (DESANTIS *et al.*, 2017).

O câncer de mama é bastante heterogêneo e apresenta diversas alterações fenotípicas e genotípicas que implicam em alterações clínicas. Baseado na presença ou ausência de receptores de superfície celular, os cânceres de mama são clinicamente divididos em três tipos: HR<sup>+</sup> (positivo para receptores de hormônios), HER2<sup>+</sup> (positivo para *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) e o triplo negativo (TANG *et al.*, 2016). O câncer de mama HR<sup>+</sup> apresenta receptores para estrogênio (ER) e progesterona (PR), é o mais comum dos tumores de mama, compreendendo cerca de 85% dos casos e pode ser classificado entre luminal A (HER2<sup>-</sup>) ou luminal B (HER2<sup>+</sup>) (TANG *et al.*, 2016). O câncer de mama HER2<sup>+</sup> é do tipo que apresenta o HER2, compreende a 15 a 20% dos casos (LOIBL & GIANNI, 2017). O câncer de mama triplo negativo (TNBC, do inglês *Triple-negative Breast Cancer*) representa de 12 a 24% dos casos. TNBC é caracterizado pela ausência de receptores de estrogênio e progesterona e por não superexpressar HER2 (SCHMADEKA *et al.*, 2014).

Os três tipos de câncer de mama podem apresentar metástases, sendo que os cânceres metastáticos ainda não têm cura e apresentam uma taxa de sobrevivência em 5 anos de apenas 25% (CARDOSO *et al.*, 2017). O TNBC é o tipo de tumor de mama que mais frequentemente apresenta recorrência local e metástases distantes, sendo também o tipo que mais apresenta metástases nas vísceras e no sistema nervoso central (HORTON *et al.*, 2018).

Os cânceres de mama do tipo HR<sup>+</sup> são geralmente tratados com terapias hormonais com antagonistas e moduladores da expressão de ER ou inibidores de aromatase, que impedem a síntese de estrogênio. Estas estratégias terapêuticas em geral apresentam bons resultados, entretanto entre 20 e 30% dos pacientes apresentam resistência (TANG *et al.*, 2016). O câncer de mama do tipo HER2<sup>+</sup>, são geralmente tratados com drogas antagonistas do HER2 (TANG *et al.*, 2016). O TNBC é o câncer de mama com o pior prognóstico, devido ao fato de não apresentar os alvos terapêuticos dos outros dois tipos de câncer de mama, sendo então tratado com quimioterápicos comuns e/ou radioterapia (SCHMADEKA *et al.*, 2014; KALIMUTHO *et al.*, 2015). Embora as pacientes com TNBC que recebem radioterapia associada a outros tratamentos tenham um melhor prognóstico que as pacientes que não receberam, os TNBC são mais radioresistentes que outros tipos de tumores de mama e acredita-se que isto se deva à expressão de ERp29, HER1 e mir-27 (KINDTS *et al.*, 2017).

#### 1.8.2 Sarcoma de Ewing

Sarcomas são tumores que ocorrem em tecidos musculares e conectivos, como ossos, tendões e cartilagens. O Sarcoma de Ewing (SE) é altamente agressivo e ocorre usualmente em ossos (cerca de 87% dos casos), predominantemente na pelve, fêmur, tíbia, escapula e costelas, porém pode surgir em qualquer osso. SE também pode ser extra ósseo, afetando tecidos na parede torácica, cavidade pleural e músculos (GRÜNEWALD *et al.*, 2018; HEMAVARTHY & JOSÉ, 2018).

Sarcoma de Ewing, embora seja um tumor raro, é o terceiro mais frequente em pacientes entre 10 e 24 anos de idade e o segundo tumor ósseo maligno que mais afeta crianças e adolescentes (BUCKLEY *et al.*, 1998; HUH *et al.*, 2017). Corresponde a 10% dos tumores ósseos malignos em crianças e adolescentes e a 3% dos tumores malignos infantis (PATERAKIS *et al.*, 2017). Em 27% dos casos, o SE afeta pacientes até 10 anos de idade, 64% dos casos pacientes que possuem entre 10 e 20 anos e em 9% dos casos, pacientes entre 20 e 30 anos (HEMAVARTHY & JOSÉ, 2018). SE afeta principalmente indivíduos brancos e do sexo masculino e a taxa de sobrevivência em 5 anos é de apenas 50% (BUCKLEY *et al.*, 1998; DAMRON *et al.*, 2007). A incidência em descendentes de europeus é de 1.5 casos por milhões de crianças e adultos jovens, enquanto em descendentes de asiáticos e africanos é de somente 0,8 e 0,2, respectivamente (GRÜNEWALD *et al.*, 2018). Aproximadamente 25% dos pacientes apresenta metástases já no momento do diagnóstico, sendo pulmão, ossos e medula óssea os locais de metástase mais comuns (BALAMUTH & WOMER, 2010; PATERAKIS *et al.*, 2017).

Os sintomas do SE incluem dor localizada, dor nas costas (em caso de tumor periespinhal, retropeitoral ou pélvico), massa palpável massa, e inchaço local. Em casos de tumores com metástases, o paciente pode apresentar febre, perda de peso, fadiga, mal-estar e falta de apetite (HEMAVARTHY & JOSÉ, 2018).

SE é caracterizado por células pequenas com forma oval/arredondada que apresentam CD99 na membrana células e translocações gênicas entre membros das famílias TET/FET (genes TLS/FUS, EWSR1 e TAF15) e ETS (E26) (GRÜNEWALD et al., 2018). Α glicoproteína CD99 (Single Chain Type 1) codificada pelo gene MIC2 parece ser envolvida na tumorigênese do SE, afetando entre outros fatores, a adesão e migração celular, impedindo a diferenciação neural (KIM & PARK, 2016). Uma característica comum do SE é a translocação da proteína EWSR1 (Ewing's Sarcoma Breakpoint Region 1) do chromossomo 22 (22q12) com a proteína FLI1 (Friend Leukaemia Integration 1 Transcription Factor) no chromossomo 11 (11q24), levando a formação da oncoproteína EWSR1-FLI1, que age como um fator de transcrição envolvido na regulação da expressão de vários genes envolvidos na tumorigêneses do SE, como genes ligados à angiogênese (VEGF, CCND1, TSD1/2), imortalização (hTERT), e outros (KIM & PARK, 2016). Somente 15% dos casos de SE são negativos para a oncoproteína EWSR1-FLI1, apresentando outras fusões de EWSR1 com outras proteínas da família ETS, como ERG (Encoding transcriptional regulator), originando EWSR1- ERG. Outras variações de fusões entre proteínas codificadas por genes das famílias TET/FET e ETS podem também ser observados. Estas variações genéticas podem estar ligadas a alterações clínicas (GRÜNEWALD et al., 2018).

O tratamento de pacientes com SE, pode ser feito através de cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Entretanto, esses tratamentos não apresentam bons resultados em pacientes com metástases (BALAMUTH & WOMER, 2010). Radioterapia, especialmente quando utilizada para tratar tumores grandes (maiores que 8cm de diâmetro ou 200ml de volume) apresentam altas taxas de recorrência (aproximadamente 35% dos casos). A radioterapia definitiva é indicada somente em caso de lesões que não podem ser operadas, incluindo cicatrizes de cirurgia ou biópsia, e as doses são prescritas de acordo com o tamanho do tumor, irradiando também uma área de segurança de 2 cm ao redor do tumor (GASPAR et al., 2015). O tratamento cirúrgico pode incluir a remoção do tumor localizado e de metástases (HEMAVARTHY & JOSÉ, 2018). A ressecção cirúrgica é prescrita quando é possível remover o tumor e uma área de segurança ao seu redor, em 10% dos casos é indicada a amputação completa do membro afetado. A radioterapia pós-operatória é recomendada em caso de ressecção incompleta do tumor, porém os benefícios dessa estratégia terapêutica ainda vêm sendo discutidos devido a resultados conflitantes obtidos (GASPAR et al., 2015). Em tratamentos quimioterápicos, é comum a prescrição de dois ou mais agentes quimioterápicos combinados que possuam diferentes mecanismos de ação, por exemplo, vincristina,

dactinomicina, doxorubicina, ciclofosfamida e isofosamida (ZHANG *et al.*, 2018). Vários estudos têm sido feitos usando várias combinações de quimioterápicos, entretanto mesmo combinações com boas respostas iniciais não tem melhorado a taxa de sobrevivência ou a taxa de recorrência a longo prazo (GASPAR *et al.*, 2015).

#### 1.9 Mecanismo de ação de nanopartículas a base de prata

As células são semipermeáveis e permitem a passagem de moléculas de modo seletivo por meio de diferentes mecanismos, por exemplo as moléculas pequenas e apolares, água e gases como o oxigênio e o gás carbônico, conseguem atravessar por difusão de acordo com seus gradientes de concentração. Enquanto os íons, mesmo sendo moléculas pequenas dependem de transporte através de proteínas de membrana, pois possuem carga. Moléculas grandes e hidrofílicas, no entanto, dependem dos processos de endocitose para entrar nas células (AHMAD et al., 2019). A entrada de nanopartículas na maioria das células de mamíferos é mediada por endocitose, podendo ou não ser um transporte mediado por clatrina e caveolina (PONGRAC *et al.*, 2018).

AgNPs com tamanhos entre 10 e 75 nm, por exemplo, foram captadas por células pulmonares BEAS-2B sem diferenças significativas na quantidade de captação entre os diferentes tamanhos de nanopartículas. As nanopartículas foram encontradas intracelularmente dentro de vesículas, sendo a internalização dependente de diferentes mecanismos ativos de transporte, tais como: endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina, fagocitose dependente de actina e macropinocitose. Desse modo é possível concluir que em uma mesma célula as nanopartículas podem ser internalizadas de diversas formas (GLIGA *et al.*, 2014).

SINGH & RAMARAO (2012), no entanto, quando trataram macrófagos RAW264.7 com AgNPs observaram que as nanopartículas foram internalizadas pelas células e se encontravam próximas a periferia celular livre no citoplasma. Utilizando inibidores farmacológicos para analisar os mecanismos de captação celular das AgNPs, concluíram que a internalização de nanopartículas se dava principalmente por fagocitose mediada por receptores *scavenger* (SR). Quando um ligante se liga ao SR e é internalizado juntamente com ele, ocorre a formação do endossoma que depois se funde a um lisossomo. De modo alternativo, as nanopartículas podem ter se desviado dessa via endocítica sendo liberados no citoplasma. Outra hipótese é a de que o SR preso a membrana plasmática sofre flip-flop

(revisado em GLATZ *et al.*, 2010), e nesse processo a AgNP que estaria ligado inicialmente do lado extracelular poderia se dissociar ao chegar no citoplasma.

A composição química da superfície das nanopartículas influencia em sua captação pelas células, como demonstrado por PONGRAC *et al*, (2018) que tratou células tronco neurais de camundongos com AgNPs e viu que as nanopartículas cobertas com AOT (bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio), PVP (polivinilpirrolidona) e PLL (Poli-L-Lisina) foram captadas pelas células em maior quantidade do que nanopartículas cobertas com BSA (Albumina do Soro Bovino) e CTAB (Brometo de Cetrimônio), sendo a macropinocitose a principal rota de internalização de todas as nanopartículas, que intracelularmente foram encontradas em endossomos.

Quando as nanopartículas são expostas a fluidos biológicos, sua superfície pode adsorver biomoléculas, especialmente proteínas presentes na solução formando a chamada proteína-corona que altera significativamente a superfície das nanopartículas, modificando inclusive sua capacidade de interação com as células (AHSAN *et al.*, 2018). BARBALINARDO *et al.* (2018) demonstrou que células NIH-3T3 somente conseguem internalizar AgNPs com proteína-corona, assim, quando são cultivadas em meio livre de soro e tratadas com AgNPs não expostas a proteínas séricas as células não sofrem nenhum efeito tóxico causado pelas nanopartículas, sugerindo que a captação de nanopartículas é mediada pela proteína-corona. Tal grupo demonstrou ainda que AgNPs cobertas com OEG (Oligo(etilenoglicol) adsorvem muito menos proteínas que AgNPs cobertas com citrato de sódio, sendo essas últimas mais captadas pelas células e com toxicidade mais alta.

A forma das nanopartículas também pode influenciar na sua captação celular como demonstrado por GRAF *et al.* (2018) que tratou células tronco mesenquimais humanas com AgNPs de formato esférico e prismático (trigonal) e observou que as nanopartículas de formato prismático foram mais internalizadas pelas células e também dissolveram mais depressa liberando íons Ag<sup>+</sup>. Esse fator se deve ao efeito Gibbs-Thomson que se refere a uma alta energia de superfície encontrada em áreas de alta curvatura, como nos vértices do nanoprisma. GRAF *et al.* (2018) demonstraram também que esse comportamento pode variar de uma linhagem celular para outra, visto que células HaCat (queratinócitos humanos) tratadas com as mesmas nanopartículas captaram igualmente AgNPs dos dois formatos.

AgNPs, tem seus efeitos citotóxicos atribuídos à liberação de íons de prata em meio aquoso e à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem induzir diversos danos celulares e causar apoptose (KITTLER *et al.*, 2010; CHENG *et al.*, 2013). GLIGA *et al* 

(2014) demonstrou que AgNPs de tamanhos entre 10 e 75 nm liberavam Ag<sup>+</sup> em solução e que essa liberação aumentava com o tempo e é maior em nanopartículas menores, o que explica o motivo de nanopartículas menores serem mais tóxicas. Um trabalho realizado com células HSC-3, carcinoma de células escamosas da mucosa oral humana, demonstrou que AgCl-NPs reduziram significativamente a viabilidade celular, aumentaram a geração intracelular de ROS e também o número de células apoptóticas, indicando que os efeitos de AgCl-NPs são semelhantes aos de AgNPs, podendo também ser mediados por íons Ag<sup>+</sup> (AUSTIN *et al.*, 2015).

#### 2. Justificativa

Em nível global, estima-se que 18,1 milhões de novos casos tenham surgido no ano de 2018 e, segundo a OMS, o câncer é responsável por uma em cada 6 mortes no mundo (BRAY *et al.*, 2018; OMS, 2018). O câncer é atualmente tratado por quimioterapia, radioterapia ou por meio de cirurgias (VLASHI & PAJONK, 2015). Os quimioterápicos disponíveis atualmente para o tratamento de neoplasias afetam também as células saudáveis, especialmente de medula óssea, tecidos epiteliais, do sistema retículo-endotelial e gônadas (NAZEEMA & SUGANNYA, 2014). Além disso, muitas terapias antitumorais têm uso bastante limitado devido ao desenvolvimento de resistência (SEGUIN *et al.*, 2014).

A resistência a quimioterápicos antitumorais depende de diversos fatores, entre eles a variabilidade individual de pacientes que podem apresentar baixa absorção do quimioterápico ou metabolização e excreção muito rápidas, fazendo com que a concentração da droga fique abaixo dos níveis ótimos, por exemplo. Além disso, um mesmo paciente apresenta heterogeneidade em suas células tumorais, de modo que cada célula tumoral de cada paciente pode apresentar uma composição genética diferente que depende não só do tecido onde ela foi originada, mas também do padrão de ativação de oncogenes e de genes supressores de tumores e além de mutações aleatórias, assim cada célula pode expressar diferentes conjuntos de genes de resistência à drogas (GOTTESMAN, 2002).

A resistência às drogas antitumorais pode ser intrínseca ou adquirida. É intrínseca quando ela existia previamente ao tratamento e adquirida quando ao longo do tratamento, células anteriormente sensíveis desenvolvem respostas adaptativas que as tornam resistentes. Além disso, devido a heterogeneidade tumoral os tratamentos podem ainda selecionar subpopulações resistentes (HOLOHAN *et al.*, 2013). Alguns dos mecanismos comuns de resistência são mutações que geram alterações nas moléculas alvo do fármaco; evasão da

apoptose; expressão de proteínas que promovem o efluxo do fármaco; capacidade de reparo de DNA, no caso de quimioterápicos que induzem danos ao DNA, e mecanismos de inativação dos fármacos (LONGLEY & JOHNSTON, 2005; HOLOHAN *et al.*, 2013).

O câncer de mama triplo negativo é o mais agressivo subtipo de tumor de mama. Por não possuir alvos terapêuticos eficientes é uma neoplasia difícil de tratar e apresenta altas taxas de metástase e recorrência pós-tratamento (SCHMADEKA *et al.*, 2014). O rápido crescimento do TNBC induz a formação de uma área de hipóxia, que induz necrose no centro da massa tumoral, promovendo uma resposta inflamatória que favorece a migração de células tumorais. Esses eventos ajudam a promover a metástase, o que torna necessário um tratamento sistêmico, aumenta as chances de recorrência e reduz as chances de sobrevivência do paciente (ARROYO-CRESPO *et al.*, 2019).

O osteosarcoma de Ewing, é um tumor maligno que afeta principalmente crianças e adultos jovens. Sua grande heterogeneidade celular o torna bastante agressivo, sendo determinante para sua progressão e para seu alto potencial metastático (BAILEY *et al.*, 2019). Cerca de 25% dos pacientes apresentam metástase, sendo pulmão, ossos e medula óssea os sítios metastáticos mais comuns. O tratamento dos pacientes pode ser feito por meio de cirurgia, radioterapia e quimioterapia, no entanto, estes tratamentos não apresentam bons resultados em pacientes com metástase (BALAMUTH & WOMER, 2010).

Devido à resistência a tratamentos antitumorais (ZHOU *et al.*, 2015; SAMUEL *et al.*, 2016) têm sido estudadas novas alternativas de tratamentos. Neste contexto, as nanopartículas metálicas, como as de prata, têm sido demonstradas eficientes no tratamento de câncer *in vivo* e *in vitro* com múltiplos mecanismos de citotoxicidade como a indução de danos ao DNA, lisossomos e à mitocôndrias com indução da produção de ROS que pode levar a apoptose e peroxidação de lipídeos (RUTBERG *et al.*, 2007; GURUNATHAN *et al.*, 2013; WEI *et al.*, 2015). O fato de agirem simultaneamente por várias vias é a principal vantagem das nanopartículas em relação aos quimioterápicos, porque dificulta o desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte das células neoplásicas (WEI *et al.*, 2015). E a resistência aos quimioterápicos é atualmente o maior gargalo que limita a efetividade dos tratamentos e acredita-se que seja responsável por mais de 90% dos casos de falha no tratamento de neoplasias (LONGLEY & JOHNSTON, 2005). Portanto, há atualmente grande interesse em desenvolver métodos ecologicamente corretos, reprodutíveis e de baixo custo para a produção de nanopartículas metálicas como AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs, por exemplo, visando uma possível aplicação no tratamento de tumores. Sendo também importante avaliar o efeito destas

nanopartículas contra células tumorais e não tumorais buscando compreender os mecanismos pelos quais agem essas nanopartículas.

#### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antitumoral e identificar mecanismos de indução de citotoxicidade de nanopartículas de cloreto de prata e prata/cloreto de prata sintetizadas via rota verde.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito antiproliferativo de AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs em células tumorais e não tumorais.

- Avaliar o efeito do tratamento com AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs na condensação nuclear.

- Avaliar o efeito de AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs na viabilidade.

- Avaliar o efeito de AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs na produção de ROS.

- Análise multiparamétrica da nanotoxicidade induzida por AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs em células tumorais e não tumorais através de avaliação do potencial de membrana mitocondrial, acidificação lisossomal, avaliação da área celular e da polimerização do citoesqueleto.

- Avaliar o efeito da exposição à concentrações subletais de Ag/AgCl-NPs na morfologia celular.

#### 4. Materiais e Métodos

#### 4.1 Cultivo de microalgas e síntese de nanopartículas de Cloreto de Prata

As microalgas da espécie *Chlorella vulgaris* (UTEX 2714) foram adquiridas do banco de microalgas da Universidade do Texas (UTEX), USA. Foram cultivadas em meio ASM-1 (0,17g/L de NaNO<sub>3</sub>; 0,041 g/L de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 0,049 g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,029 g/L de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 17,4 mg/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 35,6 mg/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O; 2,48 mg/L de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,39 mg/L de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 1,08 mg/L de FeCl<sub>3</sub>. 6H<sub>2</sub>O; 0,335 mg/L de ZnCl<sub>2</sub>; 19µg/L de CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 1,4 µg/L de CuCl<sub>2</sub> e 7,44 mg/L de EDTA Na<sub>2</sub>), pH 6,8 a 25°C com fotoperíodo de 12h:12h (escuro:claro) e intensidade luminosa de 123.47  $\pm$  8.23 µmol de fótons/m<sup>2</sup>s, mensurada utilizando um medidor de luminosidade Heinz Walz Gmbh equipado com sensor s/n: SQSA0404.

As nanopartículas de cloreto de prata (AgCl-NPs) foram sintetizadas utilizando o sobrenadante do cultivo de *C. vulgaris*. Para isto, as microalgas foram cultivadas por 21 dias nas condições descritas acima e as células foram então separadas do meio de cultivo por
centrifugação (3000 g por 10 min). O meio de cultura, livre de células, foi então incubado com 3,5 mM de nitrato de prata (Merck), protegido da luz a 25°C por 5 dias. Após o período de incubação a solução foi centrifugada a 38360g por 20 min. e as nanopartículas produzidas foram suspensas em citrato de sódio 1% (FERREIRA *et al.*, 2017).

## 4.2 Cultivo de leveduras e síntese de nanopartículas de Prata/Cloreto de Prata

Leveduras da espécie *Candida lusitaniae* foram cultivadas por 24h a 30°C em meio rico (4% de glicose, 1% de peptona bacteriológica e 1% de extrato de levedura, pH 6,5). Após 24h de crescimento, foi adicionado nitrato de prata (Merck) a uma concentração final de 3,5 mM. As células foram então cultivadas por 7 dias a 30°C, ao abrigo da luz e sob agitação a 150 rpm. Em seguida o cultivo foi centrifugado a 2720g por 15 min visando a separação das leveduras do meio de cultivo contendo nanopartículas. Posteriormente, o sobrenadante foi centrifugado a 38360g por 20 min. O *pellet*, contendo Ag/AgCl-NPs foi ressuspenso em citrato de sódio 1% (EUGENIO *et al.*, 2016).

## 4.3 Avaliação do efeito antitumoral de AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs

#### 4.3.1 Células

A avaliação da nanotoxicidade e efeito antitumoral das nanopartículas (AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs) em células humanas foi feita utilizando as linhagens MDA-MB-436 (adenocarcinoma mamário triplo negativo), BT-474 (adenocarcinoma do ducto da glândula mamária) e A673 (sarcoma de Ewing). Como controle foi utilizada a linhagem não tumoral RPE-1 (epitélio pigmentado da retina). As linhagens MDA-MB-436 e BT-474 foram cultivadas em meio RPMI GlutaMAX (Gibco, ref.: 6187010) e as linhagens A673 e RPE-1 em meio DMEM *high glucose* GlutaMAX (Gibco, ref.: 61965026). Todas as linhagens tiveram o meio suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (Penicillin-Streptomycin 10000 U/mL, Gibco, ref.:15140122) e foram mantidas em estufa com a 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Ao atingirem confluência, as células foram ressuspensas pela ação da solução enzimática tripsina-EDTA 0,05% (Gibco, ref.: 25300054) por 2 a 5 minutos a 37°C. Para a realização dos experimentos, as células em suspensão foram contadas (Cellometer<sup>®</sup> Auto T4, Nexcelom Bioscience) e semeadas em placas de 96 poços, a uma densidade celular de 4 x 10<sup>3</sup> células/poço.

## 4.3.2 Avaliação do efeito antiproliferativo

Um inóculo de células em fase exponencial de crescimento foi plaqueado em placas pretas de fundo transparente de 96 poços a uma densidade de 4 x  $10^3$  células/poço. Após 24h, as células foram tratadas com Ag/AgCl-NP (0; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 ou 12,5 µg/mL) ou AgCl-NP (0; 2,5; 5; 10; 15; 20; 30 ou 40 µg/mL). Foram feitos 6 poços para cada condição de tratamento. Nos tempos 0, 24, 48 e 72h de tratamento com as nanopartículas, as células foram coradas com 1µM Hoechst 33258 (Termo Fisher ref.: H1399) e o sistema de análise celular de alto conteúdo GE InCell Analyzer 2200 (GE Health-Care Life Sciences) foi utilizado para gerar automaticamente imagens de fluorescência (objetiva de 10X,  $\lambda_{em}$  Hoechst 461 nm, filtro DAPI, região espectral:  $432 \pm 48$  nm) de 6 campos aleatórios de cada poço. As análises das imagens adquiridas foram feitas no software IN Cell Analyzer 1000 workstation (GE Healthcare Life Sciences), utilizando algoritmos de detecção automática de objetos (núcleos). Após a segmentação dos objetos, estes foram automaticamente quantificados para estimativa da proliferação celular. A medida da compactação nuclear foi calculado a partir da fórmula:  $[2^*\pi^*(G^*G^2)]/A$ , onde A representa a área do objeto e G representa o "raio de giro" que é uma média do raio do objeto, ou seja, um valor referente a distribuição dos componentes de um objeto ao redor de um eixo. A taxa de crescimento (µ) e o tempo de duplicação (T) foram calculados conforme descrito por SHERLEY et al. (1995), utilizando as fórmulas  $N_f = N_0 2^{\mu t}$ e T =  $\ln(2)/\mu$ , respectivamente, onde N<sub>f</sub> representa o número final de células, N<sub>0</sub> o número inicial de células, µ é a taxa específica de crescimento, t é o tempo de cultivo, ln é o logaritmo natural e T é o tempo de duplicação do cultivo.

# 4.3.3 Avaliação da viabilidade celular

As células foram plaqueadas e tratadas com nanopartículas a base de prata conforme descrito no tópico 4.3.2. Nos tempos 24, 48 e 72h foram coradas por 30 mim a 37°C com 1µM de Hoechst 33258 (Termo Fisher ref.: H1399) e com o kit LIVE/DEAD<sup>TM</sup> Viability/Cytotoxicity Kit, for mammalian cells (ThermoFisher ref.: L3224) de acordo com as instruções do fabricante. Imagens das células marcadas com os corantes foram obtidas utilizando o sistema de análise celular de alto conteúdo GE InCell Analyzer 2200 (GE Healthcare Life Sciences), utilizando os filtros DAPI, FITC e Cy3 (Regiões espectrais: 432 ± 48 nm, 525 ± 48 nm e 597 ± 45 nm, respectivamente), para a obtenção de imagens dos corantes Hoechst, Calceína e Homodímero de etídio (EthD-1, do inglês *Ethidium homodimer*-1), respectivamente. A partir de imagens de fluorescência obtidas, foram feitas as análises no

software IN Cell Analyzer 1000 workstation (GE Healthcare Life Sciences), utilizando algoritmos de detecção automática de objetos e filtro de classificação linear 2D para determinação automática do percentual de células viáveis e mortas.

# 4.3.4 Avaliação da ocorrência de apoptose

Para avaliar se o tratamento com nanopartículas a base de prata induz apoptose, as células foram plaqueadas e tratadas com nanopartículas conforme descrito no tópico 4.3.2. Nos tempos 24, 48 e 72h foram marcadas por 30 mim a 37°C com os corantes fluorescentes 1  $\mu$ M de Hoechst 33258 (Thermo Fisher ref.: H1399), 0,4  $\mu$ M de EthD-1 (Thermo Fisher ref.:E1169) e 8  $\mu$ M de CellEvent<sup>TM</sup> Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Thermo Fisher ref.:C10423). Imagens das células coradas foram obtidas utilizando o sistema de análise celular de alto conteúdo GE InCell Analyzer 2200 (GE Healthcare Life Sciences), utilizando os filtros DAPI, FITC e Cy3 (Regiões espectrais: 432 ± 48 nm, 525 ± 48 nm e 597 ± 45 nm, respectivamente), para a obtenção de imagens dos corantes Hoechst, CellEvent<sup>TM</sup> e EthD-1, respectivamente. A partir de imagens de fluorescência obtidas, foram feitas as análises no software IN Cell Analyzer 1000 workstation (GE Healthcare Life Sciences), utilizando algoritmos de detecção automática de objetos e filtro de classificação (do tipo "*decision tree*") para determinação automática do percentual de células apoptóticas (excluindo células mortas marcadas por ETh-1).

## 4.3.5 Avaliação da produção de ROS

Para avaliar se o tratamento com nanopartículas a base de prata induz a produção de ROS, as células foram plaqueadas e tratadas com nanopartículas conforme descrito no tópico 4.3.2. Nos tempos 24, 48 e 72h foram marcadas por 30 mim a 37°C com os corantes fluorescentes 1  $\mu$ M de Hoechst 33258 (Thermo Fisher ref.: H1399) e Dihydroethidium (DHE) (Thermo Fisher, ref.: D23107). Imagens das células marcadas com os corantes foram obtidas utilizando o sistema de análise celular de alto conteúdo GE InCell Analyzer 2200 (GE Healthcare Life Sciences), utilizando os filtros DAPI e Cy3 (Regiões espectrais: 432 ± 48 nm, e 597 ± 45 nm, respectivamente), para a obtenção de imagens dos corantes Hoechst e DHE, respectivamente. A partir de imagens de fluorescência obtidas, foram feitas as análises no software IN Cell Analyzer 1000 workstation (GE Healthcare Life Sciences), utilizando algoritimos de detecção automática de objetos e medição da intensidade de fluorescência para estimar modificações na produção de ROS pelas células tratadas.

## 4.3.6 Avaliação multiparamétrica de citotoxicidade

Para avaliar outros efeitos citotóxicos dos tratamentos com nanopartículas, as células foram tratadas com nanopartículas a base de prata conforme descrito no tópico 4.3.2. Após 48h de tratamento foram coradas com 1 µM de Hoechst 33258 (Thermo Fisher ref.: H1399) (para identificar núcleos celulares e fazer sua quantificação) combinado com 1 µM de LysoTracker<sup>®</sup> Red DND-99 (Molecular Probes ref.: L7528) (para corar os lisossomos, que foram avaliados quanto à intensidade de fluorescência para avaliar a acidificação lisossomal) 50 nM de Tetrametilrodamina, (TMRM, do inglês Tetramethylrhodamine) (Thermo Fisher ref.: I34361) (para corar mitocôndrias cujo potencial de membrana permanece integro) ou 1,5 µg/mL de CellMask<sup>™</sup> Deep Red Plasma Membrane Stain (Thermo Fisher ref.: C10046) (para marcar a membrana citoplasmática das células e estimar a área das células.). O efeito dos tratamentos com nanopartículas sobre os filamentos de actina do citoesqueleto foram avaliados em amostras fixadas com 3,7% de formaldeído por 15 min, bloqueadas com 10% de albumina do soro bovino (BSA) e 2% saponina em PBS por 5 min, permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 por 2 min e coradas com 165 µM de Faloidina-Rodamina (Thermo Fisher ref.: R415) e 2 µg/mL de DAPI (Thermo Fisher ref.: D1306) por 30 min. Após a coloração, foram feitas imagens de 6 campos aleatórios/poço no total de 6 poços por condição experimental utilizando o sistema de análise celular de alto conteúdo GE InCell Analyzer 2200 (GE Healthcare Life Sciences), com objetiva de 20X. Foram utilizados os filtros: DAPI, para a obtenção de imagens dos corantes Hoechst ou DAPI (Região espectral:  $432 \pm 48$  nm); Texas Red, para obtenção de imagens do corante LysoTracker<sup>®</sup> Red (Região espectral: 620 ± 30 nm); Cy3, para a obtenção de imagens dos corantes TMRM ou Rodamina (Região espectral: 597 ± 45 nm); e Cy5 para a obtenção de imagens do corante CellMask<sup>™</sup> (Região Espectral:  $684 \pm 25$  nm). A partir de imagens de fluorescência obtidas, foram feitas as análises no software IN Cell Analyzer 1000 workstation (GE Healthcare Life Sciences), utilizando algoritmos de detecção automática de objetos.

# 4.4 Avaliação dos efeitos da exposição à Ag/AgClNPs na morfologia de células tumorais e não tumorais

# 4.4.1 Células

A avaliação dos efeitos morfológicos das nanopartículas (Ag/AgCl-NPs) em células humanas foi feita utilizando as linhagens MDA-MB-468 (adenocarcinoma mamário triplo

negativo) e como controle foi utilizada a linhagem não tumoral HFF-1 (Fibroblasto de prepúcio humano). A linhagem MDA-MB-468 foi cultivada em meio L15 (Sigma Aldrich, ref.: L5520) e a linhagem HFF-1 foi cultivada em meio DMEM *high glucose* (Gibco, ref.: 12100046) e ambas tiveram o meio suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (Penicillin-Streptomycin 10000 U/mL, Gibco, ref.:15140122) e foram mantidas em estufa com a 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

## 4.4.2 Avaliação da viabilidade celular

Ao atingirem confluência, as células foram ressuspensas pela ação da solução enzimática tripsina-EDTA 0,05% (Gibco, ref.: 25300054) por 2 a 5 minutos a 37°C. Para a realização dos experimentos, as células em suspensão foram contadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas de 96 poços, a uma densidade celular de 1 x 10<sup>4</sup> células/poço. Após 24h, as células foram tratadas com Ag/AgCl-NP (0; 2,5; 5; 10; 20; 30; 40 ou 50 µg/mL). Foram feitos 3 poços para cada concentração de nanopartícula. Após 48h de tratamento, foi feito o ensaio de viabilidade utilizando o kit CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, ref.: G5421) conforme recomendações do fabricante e após 2h de incubação a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> as amostras tiveram as absorbâncias lidas em espectrofotômetro (TECAN Infinite M200 PRO) no comprimento de onda 490 nm. A viabilidade foi calculada utilizando a seguinte equação: V% = (DOT/DOC) x 100, onde V representa a viabilidade, DOT representa a densidade óptica da amostra teste medida a 490 nm, e DOC representa a densidade óptica do grupo controle (cultivado com 0 µg/mL de Ag/AgCl-NP) medida a 490 nm. O IC<sub>50</sub> foi calculado utilizando o software GraphPad Prism 5.

# 4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As linhagens HFF-1 e MDA-MB-468 foram semeadas em lamínulas circulares de 12mm dentro de placas de 24 poços a uma densidade celular de 2,5 x  $10^4$  células/poço. Após 24h, as células foram tratadas com 0 ou 2,2 µg/mL de Ag/AgCl-NP. Foram feitas 3 lamínulas para cada concentração de nanopartícula. Após 48h de tratamento, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS pré-aquecido a 37°C e fixadas em 2,5% de glutaraldeído, 4% de formaldeído em 0,1 M de tampão cacodilado de sódio pH 7,3. As amostras foram então lavadas três vezes em PBS e desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30%,

50%, 70%, 90% e 3 vezes 100%) por 10 min a cada concentração e secas no ponto crítico do CO<sub>2</sub>. As amostras secas foram revestidas com 5 nm de platina e observadas no microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 450F (5 kV).

# 4.6 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando intervalo de confiança de 95% no software GraphPad Prism 5, os testes estatísticos utilizados foram: Anova one-way com pósteste de Tukey ou Anova two-way com pósteste de Bonferroni. Os experimentos dos tópicos 4.3 e 4.4 foram realizados em triplicatas independentes enquanto os experimentos do tópico 4.5 foram realizados em seis replicatas independentes.

#### 5. Resultados

# 5.1 Avaliação da nanotoxicidade e efeito antitumoral de AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs

Para avaliar o potencial antitumoral e a nanotoxicidade de AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs produzidas biologicamente foram utilizadas a linhagem não tumoral RPE-1 (epitélio pigmentado da retina) e as linhagens tumorais BT-474 (adenocarcinoma do ducto da glândula mamária), MDA-MB-436 (adenocarcinoma mamário triplo negativo) e A673 (sarcoma de Ewing). As quatro linhagens celulares humanas foram avaliadas por meio da técnica de análise celular de alto conteúdo (HCA) quanto à proliferação celular, viabilidade, apoptose, produção de ROS, acidificação lisossomal, potencial de membrana mitocondrial, polimerização dos microfilamentos de actina e área celular.

#### 5.1.1 Proliferação celular

Para avaliar se AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs prejudicam o crescimento celular as linhagens RPE-1, BT-474, MDA-MB-436 e A673 foram cultivadas por 72h com concentrações entre 0 e 40 µg/mL de AgCl-NPs ou 0 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs. As concentrações utilizadas para cada nanopartícula são concentrações subletais que foram escolhidas após experimentos preliminares com concentrações que variaram entre 0 e 200 µg/mL de nanopartículas (dados não mostrados). As Figuras 2 e 3 demostram a proliferação celular das quatro linhagens após 72h de tratamento com AgCl-NPs, onde é possível observar que as células da linhagem RPE-1 não tratadas apresentaram em 72h um crescimento de 454,85  $\pm$  130,06% em relação ao tempo 0. Quando essas células foram cultivadas com concentrações entre 2,5 e 30 µg/mL de AgCl-NPs apresentaram crescimento igual ao grupo controle ao longo de todo o tempo de experimento. A inibição do crescimento celular em

relação ao grupo controle, foi observada somente em células cultivadas na presença de 40  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs por 72h (28,84 ± 9,97%) (Figura 2a).

As células tumorais da linhagem BT-474 não tratadas cresceram em 72h 102,47  $\pm$  22,10% em relação à mesma condição no tempo 0 (Figura 2b). Em 24h, todos os grupos de células BT-474 tratados com AgCl-NPs apresentam crescimento semelhante ao do grupo controle. Em 48h de tratamento, as células desta mesma linhagem cultivadas com 2,5 µg/mL de AgCl-NPs apresentam um crescimento celular estatisticamente significativo de 27,83  $\pm$  27,77% superior ao do grupo controle. Por outro lado, o grupo tratado com 30 µg/mL de AgCl-NPs apresentou redução de 22,12  $\pm$  9,97% no crescimento celular, enquanto os demais grupos apresentaram número de células semelhante ao grupo controle. Após 72h de tratamento, os grupos cultivados com 2,5, 5 e 15 µg/mL de AgCl-NPs apresentaram crescimento celular semelhante ao do grupo control enquanto os grupos cultivados com 10, 20, 30 e 40 µg/mL de AgCl-NPs apresentaram reduções no crescimento celular de 23,12  $\pm$  20,86%, 30,12  $\pm$  8,72%, 35,94  $\pm$  8,53%, 20,54  $\pm$  10,31%, respectivamente.

Após 72h de cultivo na condição controle as células da linhagem tumoral MDA-MB-436 cresceram 244,76  $\pm$  87,52% em relação ao tempo inicial. Em 24 e 48h de cultivo os grupos de células tratados com concentrações entre 2,5 e 40 µg/mL de AgCl-NPs apresentam crescimento significativamente menor que o grupo controle (Figura 2c). Já em 72h, as células tratadas com 2,5 µg/mL de AgCl-NPs apresentam crescimento semelhante ao do grupo controle, enquanto reduções de 39,97  $\pm$  20,55%, 50,75  $\pm$  15,13%, 65,99  $\pm$  10,39%, 48,30  $\pm$ 12,52%, 56,35  $\pm$  9,90% e 63,91  $\pm$  8,69% são observadas nos grupos de células cultivados com 5, 10, 15, 20, 30 e 40 µg/mL de AgCl-NPs, respectivamente.

A linhagem tumoral A673 cultivada por 72h na condição controle apresentou crescimento celular de 252,50  $\pm$  100,02% em relação à mesma condição no tempo 0 (Figura 2d). As células desta linhagem tratadas por 24h com concentrações entre 2,5 e 40 µg/mL de AgCl-NPs apresentaram crescimento celular semelhante ao grupo controle, entretanto nos tempos 48 e 72h apresentam reduções significativas no crescimento. Em 72h, as reduções chegaram a 17,74  $\pm$  19,40% nas células tratadas com 2,5 µg/mL de AgCl-NPs, 58,45  $\pm$  11,53% no grupo tratado com 5 µg/mL, 55,13  $\pm$  8,94% no grupo tratado com 10 µg/mL, 60,448  $\pm$  11,69% no grupo cultivado com 15 µg/mL, 62,70  $\pm$  12,87% no grupo tratado com 20 µg/mL.



**Figura 2:** Ensaio de proliferação de células humanas tumorais e não tumorais. As linhagens (a) RPE-1, (b) BT-474, (c) MDA-MB-436 e (d) A673 foram cultivadas por 72h com 0 - 40  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 (Anova Two-way).



Figura 3: Imagens representativas do ensaio proliferação de células humanas tumorais (BT-474, MDA-MB-436 e A673) e não tumorais (RPE-1). As imagens mostram os núcleos das células após 72h de tratamento com concentrações entre 0 e 40 µg/mL de AgCl-NPs marcados com o corante fluorescente Hoechst. As barras de escala equivalem a 200 µm.

As Figuras 4 e 5 demonstram a proliferação celular das linhagens RPE-1, BT-474, MDA-MB-436 e A673 após 72h de tratamento com concentrações entre 0 e 12,5  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs. Observando os resultados é possível notar as células da linhagem RPE-1 não tratadas apresentaram crescimento em função do tempo, de modo que em 72h de cultivo o crescimento foi de 463,08 ± 145,98% em relação ao tempo 0 (Figura 4a). Em 24h de cultivo, todos os grupos de células da linhagem RPE-1 tratados com AgCl-NPs apresentaram crescimento semelhante ao grupo controle. Porém, em 48 e 72h de cultivo, os grupos de células cultivados com 7,5, 10 e 12,5  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs apresentaram reduções de 32,728 ± 6,00%, 35,27 ± 17,73% e 39,44 ± 9,04% em 48h e 20,68 ± 13,21%, 34,59 ± 24,37% e 47,50 ± 13,28% em 72h, respectivamente.

As células da linhagem BT-474 cultivadas por 72h na condição controle apresentaram crescimento de 40,66  $\pm$  32,25% em relação ao tempo 0 (Figura 4b). Os tratamentos com Ag/AgCl-NPs não induziram alterações significativas no crescimento celular em nenhum dos tempos de cultivo avaliados, exceto para as células cultivadas com 2,5 µg/mL por 48h que apresentaram redução de 17,98  $\pm$  10,14% e o grupo de células cultivado por 72h com 12,5 µg/mL que apresentaram redução de 19,51  $\pm$  9,29%.

A linhagem tumoral MDA-MB-436 quando cultivada por 72h na condição controle apresentou em relação ao tempo 0 um crescimento de  $303,20 \pm 53,56\%$  (Figura 4c). Esta mesma linhagem celular teve a proliferação inibida quando tratada por 24, 48 e 72h com concentrações entre 0,5 e 12,5µg/mL Ag/AgCl-NPs, de modo que os grupos tratados com 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NP apresentam reduções de 71,13 ± 4,76%, 74,36 ± 5,977%, 72,92 ± 4,04%, 79,62 ± 3,94%, 75,05 ± 5,94%, 69,97 ± 8,40% e 70,27 ± 6,56% no número de células, respectivamente.

Em relação ao tempo 0, a linhagem tumoral A673 cultivada na condição controle cresceu 177,90  $\pm$  60,98% em 72h (Figura 4d). A mesma linhagem quando tratada por 24, 48 e 72h com concentrações entre 0,5 a 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs apresentou redução no crescimento celular, atingindo em 72h uma redução de 46,187  $\pm$  11,43% para o grupo cultivado com 0,5 µg/mL de Ag/AgCl-NP, 61,07  $\pm$  5,37% para o grupo cultivado com 1 µg/mL de Ag/AgCl-NP, 65,409  $\pm$  4,31% para o grupo cultivado com 2,5 µg/mL de Ag/AgCl-NP, 66,833  $\pm$  5,74% para o grupo cultivado com 5 µg/mL de Ag/AgCl-NP, 66,202  $\pm$  3,55% para o grupo cultivado com 7,5 µg/mL de Ag/AgCl-NP, 66,72  $\pm$  5,21% para o grupo cultivado com 10 µg/mL de Ag/AgCl-NP e 65,53  $\pm$  4,27% para o grupo cultivado com 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NP.



**Figura 4: Ensaio de proliferação de células humanas tumorais e não tumorais.** As linhagens (**a**) RPE-1, (**b**) BT-474, (**c**) MDA-MB-436 e (**d**) A673 foram cultivadas por 72h com concentrações entre 0 e 12,5  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 (Anova Two-way)



**Figura 5: Imagens representativas do ensaio proliferação de células humanas tumorais (BT-474, MDA-MB-436 e A673) e não tumorais (RPE-1).** As imagens mostram os núcleos das células após 72h de tratamento com concentrações entre 0 e 12,5 μg/mL de Ag/AgCl-NPs marcados com o corante fluorescente Hoechst. As barras de escala equivalem a 200 μm.

## 5.1.2 Tempo de duplicação e taxa de crescimento

O tempo de duplicação, que revela o tempo necessário para dobrar o número de células no cultivo, foi estimado para as linhagens RPE-1, BT-474, MDA-MB-436 e A673 tratadas com AgCl-NPs (Tabelas 1) e Ag/AgCl-NPs (Tabela 2). Os resultados revelaram que os tratamentos com concentrações entre 2,5 e 40 µg/mL de AgCl-NPs não afetaram significativamente o tempo de duplicação da linhagem RPE-1, que na condição controle apresenta tempo de duplicação igual a 31,25 ± 7,12h (Tabela 1). A linhagem BT-474 cultivada na condição controle teve o tempo de duplicação estimado de  $82.70 \pm 9.06h$  e também não teve este significativamente afetado pelo tratamento com AgCl-NP, exceto quando cultivada com 30  $\mu$ g/mL em que apresentou aumento de 58,28  $\pm$  18,64% no tempo de duplicação. A linhagem MDA-MB-436 apresentou um tempo de duplicação igual a 51,57  $\pm$ 16,79h quando cultivado na condição controle. O tempo de duplicação da linhagem MDA-MB-436 cultivada com 2,5 e 5 µg/mL de AgCl-NPs não foi significativamente alterado, entretanto quando cultivada com 10, 15, 20, 30 e 40 µg/mL de AgCl-NPs tiveram o tempo de duplicação aumentado em 132,23  $\pm$  105,11%, 228,134  $\pm$  123,5%, 110,487  $\pm$  72,96%, 142,52  $\pm$  68,17% e 199,62  $\pm$  107,94%, respectivamente. A linhagem A673 cultivada na condição controle apresentou tempo de duplicação igual a  $51,06 \pm 17,65h$  e quando cultivada com 2,5 µg/mL de AgCl-NPs não apresentou alterações significativas no tempo de duplicação, porém quando cultivada com 5, 10, 15, 20, 30 e 40 µg/mL de AgCl-NPs apresentou aumentos de  $157,28 \pm 70,57\%$ ,  $133,46 \pm 73,16\%$ ,  $168,95 \pm 63,15\%$ ,  $193,91 \pm 101,56\%$ ,  $235,33 \pm 121,36\%$ ,  $205,60 \pm 87,77\%$ , respectivamente.

Tabela 1: Tempo de duplicação (horas) de células humanas tumorais e não tumorais tratadas com AgCl-NPs. Os símbolos \* P <0,05 e \*\*\* P <0,001 representam diferenças estatísticas significativas em relação ao controle (0  $\mu$ g/mL) da mesma linhagem celular.

AgCl-NPs (µg/mL)	RPE-1	BT-474	MDA-MB-436	A673
0	$31,25 \pm 7,12$	$82,70 \pm 9,06$	$51,57 \pm 16,79$	$51,06 \pm 17,65$
2,5	33,17 ± 4,09	83,64 ± 20,30	$50,38 \pm 11,39$	63,57 ± 15,83
5	30,73 ± 11,22	$82,\!53\pm7,\!98$	90,03 ± 32,16	122,06 ± 12,6 ***
10	$28,22 \pm 4,01$	116,81 ± 43,09	107,36 ± 27,73 ***	112,23 ± 22,48 ***
15	$28,\!68 \pm 4,\!81$	$103,25 \pm 25,78$	153,71 ± 33,72 ***	128,83 ± 20,04 ***
20	$30,\!85\pm5,\!70$	$119,83 \pm 22,26$	98,69 ± 17,22 ***	138,15 ± 25,72 ***

30	30,66 ± 7,37	131,03 ± 21,71 *	118,29 ± 22,96 ***	156,64 ± 20,61 ***
40	$44,\!18 \pm 10,\!37$	$127,36 \pm 35,91$	142,74 ± 18,85 ***	145,88 ± 24,59 ***

A linhagem RPE-1 não teve o tempo de duplicação afetado pelos tratamentos com Ag/AgCl-NPs exceto quando cultivada com 12,5 µg/mL, tratamento em que apresentou um tempo de duplicação 109,58 ± 71,02% maior (Tabela 2). A linhagem tumoral BT-474 não teve o tempo de duplicação afetado por tratamentos com Ag/AgCl-NPs, enquanto a linhagem MDA-MB-436 apresentou tempos de duplicação significativamente maiores em todas as concentrações de Ag/AgCl-NPs testadas, sendo os aumentos de 254,52 ± 50,77%, 312,52 ± 111,64%, 258,57 ± 102,59%, 419,71 ± 172,89%, 317,23 ± 87,95%, 257,84 ± 110,70% e 251,85 ± 85,78% para os tratamentos com 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs. A linhagem tumoral A673, assim como a MDA-MB-436, apresentou aumento no tempo de duplicação quando tratada com 0,5 (98,06 ± 55,23%), 1 (167,65 ± 69,56%), 2,5 (202,08 ± 78,21%), 5 (216,94 ± 97,91%), 7,5 (206,69 ± 64,33%), 10 (220,93 ± 105,49%) e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs (196,05 ± 56,56%).

Ag/AgCl-NPs (µg/mL)	RPE-1	BT-474	MDA-MB-436	A673
0	$31,05 \pm 7,55$	$127,08 \pm 37,62$	$39,06 \pm 5,03$	$62,95 \pm 18,32$
0,5	$31,93 \pm 3,43$	$136,75 \pm 35,54$	137,25 ± 17,97 ***	117,57 ± 14,83 *
1	$26,44 \pm 6,85$	$138,40 \pm 40,03$	157,49 ± 32,13 ***	160,59 ± 24,55 ***
2,5	$36,02 \pm 7,86$	$135,13 \pm 15,94$	147,17 ± 26,87 ***	178,93 ± 12,58 ***
5	$27,43 \pm 6,80$	$150,84 \pm 21,92$	199,40 ± 55,43 ***	188,48 ± 31,24 ***
7,5	$39,38\pm9,32$	$149,52 \pm 45,25$	161,56 ± 31,83 ***	183,46 ± 10,12 ***
10	$49,50 \pm 10,19$	$147,07 \pm 23,43$	138,14 ± 39,17 ***	187,99 ± 41,50 ***
12,5	63,08 ± 23,11 ***	$156,23 \pm 39,71$	134,67 ± 20,77 ***	180,99 ± 36,27 ***

Tabela 2: Tempo de duplicação (horas) de células humanas tumorais e não tumorais tratadas com Ag/AgCl-NPs. Os símbolos \* P <0,05 e \*\*\* P <0,001 representam diferenças estatísticas significativas em relação ao controle ( $0 \mu$ g/mL) da mesma linhagem celular.

As taxas de crescimento, que representam o número de vezes que as células se duplicam em um dia, também foram calculadas para as linhagens RPE-1, BT-474, MDA-MB-436 e A673 tratadas com AgCl-NPs (Tabela 3) ou Ag/AgCl-NPs (Tabela 4). A linhagem RPE-1 quando cultivada na condição controle apresentou taxa de crescimento igual a  $0,23 \pm 0,05$  e esta taxa não foi afetada pelos tratamentos com concentrações entre 2,5 e 40 µg/mL de

AgCl-NPs (Tabela 3). A linhagem BT-474 na condição controle apresentou taxa de crescimento igual a 0,08  $\pm$  0,01 sem alterações significativas quando tratada com qualquer concentração de AgCl-NPs. Por outro lado, as células das linhagens MDA-MB-436 e A673 apresentaram reduções nas taxas de crescimento quando tratadas com AgCl-NPs. MDA-MB-436 quando tratada com 2,5 µg/mL de AgCl-NP apresentou taxa de crescimento semelhante à do grupo controle, porém quando tratada com 5, 10, 15, 20, 30 e 40 µg/mL de AgCl-NP apresentaram taxas de crescimento 33,28  $\pm$  17,28%, 46,78  $\pm$  29,47%, 63,31  $\pm$  21,14%, 43,67  $\pm$  31,76%, 55,94  $\pm$  12,46% e 62,53  $\pm$  14,41% menores que a do grupo controle, respectivamente. Enquanto a linhagem celular A673, apresentou taxas de crescimento menores que a do grupo controle em todas as concentrações testadas, sendo que estas reduções foram de 16,03  $\pm$  15,93%, 58,21  $\pm$  13,47%, 54,51  $\pm$  10,43%, 60,13  $\pm$  13,94%, 62,19  $\pm$  13,98%, 66,95  $\pm$  11,44% e 64,86  $\pm$  10,13%, para os tratamentos com 2,5, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 µg/mL de AgCl-NP, respectivamente.

Tabela 3: Taxa de crescimento ( $\mu$ ) de células humanas tumorais e não tumorais tratadas com AgCl-NPs. Os símbolos \* P <0,05, \*\* P <0,01 e \*\*\* P <0,001 representam diferença estatística em relação ao controle (0  $\mu$ g/mL) da mesma linhagem celular.

AgCl-NPs (µg/mL)	RPE-1	BT-474	MDA-MB-436	A673
0	$0,23 \pm 0,05$	$0,\!08\pm0,\!01$	$0,\!14 \pm 0,\!04$	$0,\!15 \pm 0,\!04$
2,5	$0,21 \pm 0,03$	$0,\!09\pm0,\!02$	$0,\!14\pm0,\!04$	0,11 ± 0,02 **
5	$0,25 \pm 0,08$	$0,08 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,03$ *	0,06 ± 0,01 ***
10	$0,25 \pm 0,04$	$0,06 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,02$ ***	0,06 ± 0,01 ***
15	$0,25 \pm 0,04$	$0,07 \pm 0,02$	0,05 ± 0,01 ***	0,05 ± 0,01 ***
20	$0,23 \pm 0,04$	$0,06 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$ ***	$0,05 \pm 0,01$ ***
30	$0,24 \pm 0,08$	$0,05 \pm 0,01$	0,06 ± 0,0 1 ***	0,04 ± 0,01 ***
40	$0,\!17\pm0,\!05$	$0,07 \pm 0,03$	0,05 ± 0,01 ***	0,05 ± 0,01 ***

Para o tratamento com Ag/AgCl-NPs, a taxa de crescimento da linhagem RPE-1 na condição controle foi  $0,24 \pm 0,06$ , sem alterações estatisticamente significativas quando tratada com concentrações entre 0,5 e 10 µg/mL de nanopartículas, entretanto a taxa de crescimento foi reduzida em 43,24 ± 8,50% quando as células foram tratadas com 12,5 µg/mL de nanopartículas (Tabela 4). Assim como no tratamento com AgCl-NPs, a linhagem BT-474 não sofreu alterações significativas na taxa de crescimento quando tratada com concentrações entre 0,5 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs. A linhagem tumoral MDA-MB-436 apresentou taxa

de crescimento igual a 0,018 ± 0,02 na condição controle e sofreu reduções de 71,26 ± 4,45%, 73,99 ± 8,06%, 72,39 ± 7,76%, 79,415 ± 4,97%, 75,06 ± 5,75%, 69,54 ±10,37% e 70,28 ± 6,51% quando cultivada com 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs. O mesmo fenômeno foi observado com a linhagem A673, cuja taxa de crescimento na condição controle foi igual a 0,12 ± 0,03, apresentando reduções de 45,65 ± 17,31%, 60,48 ± 10,33%, 64,37 ± 12,03%, 65,93 ± 10,08%, 65,68 ± 9,89%, 63,75 ± 19,17% e 65,06 ± 7,32% quando tratada com 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs.

Ag/AgCl-NPs	DDE 1	DT <i>1</i> 71	MDA MD 426	٨ 673
(µg/mL)	KPE-1	<b>D1-4/4</b>	WIDA-WID-430	A0/5
0	$0,24 \pm 0,06$	$0,06 \pm 0,02$	$0{,}18\pm0{,}02$	$0,12 \pm 0,03$
0,5	$0,22\pm0,02$	$0,\!05\pm0,\!01$	$0,05 \pm 0,01$ ***	0,06 ± 0,01 ***
1	$0,\!28 \pm 0,\!07$	$0,05 \pm 0,01$	0,05 ± 0,01 ***	0,04 ± 0,01 ***
2,5	$0,20 \pm 0,05$	$0,05 \pm 0,01$	0,05 ± 0,01 ***	0,04 ± 0,00 ***
5	$0,26 \pm 0,06$	$0,05 \pm 0,01$	0,04 ± 0,01 ***	0,04 ± 0,01 ***
7,5	$0,18 \pm 0,04$	$0,05 \pm 0,02$	0,04 ± 0,01 ***	0,04 ± 0,00 ***
10	0,15 ± 0,03	$0,05 \pm 0,01$	0,05 ± 0,02 ***	0,04 ± 0,01 ***
12,5	$0,13 \pm 0,05*$	$0,05 \pm 0,01$	0,05 ± 0,01 ***	0,04 ± 0,01 ***

Tabela 4: Taxa de crescimento ( $\mu$ ) de células humanas tumorais e não tumorais tratadas com Ag/AgCl-NPs. Os símbolos \* P <0,05 e \*\*\* P <0,001 representam diferença estatística em relação ao controle (0  $\mu$ g/mL) da mesma linhagem celular.

## 5.1.3 Compactação nuclear

Além da quantificação de núcleos para a determinação da proliferação celular, foi feita também a medida da compactação nuclear das células tratadas com nanopartículas, visto que este é um dos indicativos de dano celular e apoptose. A compactação nuclear é calculada automaticamente pelo software de análise utilizado na segmentação dos núcleos e é representada por um valor de unidade arbitrária. Quanto menor este valor, mais compactado está o núcleo. A Figura 6 mostra os dados de compactação nuclear das linhagens RPE-1, BT-474, MDA-MB-436 e A673 tratadas com AgCl-NPs. A linhagem RPE-1 quando tratada por 24, 48 ou 72h com concentrações entre 2,5 e 30  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs não sofreu modificações no grau de compactação nuclear, entretanto quando tratadas com 40  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs apresentaram compactação nuclear de 5,22  $\pm$  1,19 % quando comparada ao grupo controle

tratado pelo mesmo tempo (Figura 6a). A linhagem BT-474 apresentou nível de compactação nuclear semelhante à do grupo controle quando cultivada com até 20  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs, entretanto na presença de 30  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs por 72h apresentou núcleos compactação de 3,04 ± 3,26% (Figura 6b). O tratamento de BT-474 com 40  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs por 24, 48 ou 72h induziu a compactação nuclear, de modo que em 72h os núcleos apresentaram compactação de 11, 91 ± 1,12% em relação ao controle.

As células da linhagem MDA-MB-436 em 24h de tratamentos com concentrações até 20  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs não apresentaram alterações na compactação nuclear, sendo que o grau de compactação é maior que o do controle nos grupos tratados com 30 e 40  $\mu$ g/mL de nanopartículas (Figura 6c). Em 48h de tratamento, as células tratadas com 20  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs, assim como as tratadas com 30 e 40  $\mu$ g/mL passaram também a apresentar núcleos mais compactados em relação ao controle. Em 72h as células tratadas com 5, 15, 20, 30 e 40  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs apresentam núcleos compactação de 1,74 ± 1,16%, 2,15 ± 0,57%, 1,55 ± 1,39%, 2,50 ± 1,31% e 3,33 ± 1,09% em relação ao grupo controle, respectivamente. Em contraste, os grupos tratados com 2,5 e 10  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs não apresentam alterações significativas no grau de compactação nuclear em relação ao controle.

A linhagem A673 quando tratada por 24, 48 e 72h com concentrações entre 5 e 40  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs apresentou núcleos mais compactados em relação ao cultivo controle (Figura 6d). Porém em 72h o tratamento com 2,5  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs passa a apresentar compactação de 2,05 ± 1,17% em relação as células não tradadas. Nesse mesmo tempo os grupos cultivados na presença de 5, 10, 15, 20, 30 e 40  $\mu$ g/mL apresentaram compactação nuclear de 4,69 ± 1,29%, 4,21 ± 0,98%, 4,54 ± 1,66%, 5,01 ± 0,85%, 5,58 ± 1,36% e 5,44 ± 0,92%, respectivamente.

Quando tratada por 24 ou 48h com até 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NP, as células da linhagem RPE-1 não apresentaram alterações significativas no grau de compactação nuclear, entretanto em 72h de tratamento com concentrações superiores a 2,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs foi observado aumento no grau de compactação nuclear (Figura 7a). Em relação às células não tratadas, a compactação nuclear a 1,48 ± 1,27% para o grupo tratado com 2,5 µg/mL, 2,23 ± 1,26% para o grupo tratado com 5 µg/mL, 2,47 ± 1,10% para o grupo tratado com 7,5 µg/mL, 2,80 ± 1,36% para o grupo tratado com 10 µg/mL e 3,28 ± 0,98% para o grupo tratado com 12,5 µg/mL. A linhagem BT-474 sofreu compactação nuclear quando cultivada por 24h com concentrações entre 1 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NP (Figura 7b). Já em 48h de tratamento, estas células apresentaram núcleo mais compacto que o grupo controle quando cultivadas com concentrações entre 2,5 e 12,5  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NP. Em 72h as células tratadas com 5, 7,5, 10 e 12,5  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NP apresentam aumentos de 9,06  $\pm$  2,05%, 13,12  $\pm$  1,90%, 14,24  $\pm$  1,65% e 15,32  $\pm$  1,99%, respectivamente, na compactação nuclear.

As células da linhagem MDA-MB-436 quando cultivadas por 24h com 0,5 µg/mL de Ag/AgCl-NP por 24h apresentam núcleo 1,97  $\pm$  1,77% mais compacto que o grupo controle (Figura 7c). Em contraste, quando tratada por 48h ou 72h com concentrações entre 0,5 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs não houve alterações significativas no grau de compactação nuclear em relação ao grupo controle. As células da linhagem A673 quando tratadas com concentrações entre 0,5 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs por 24, 48 ou 72h apresentam compactação nuclear, atingindo em 72h graus de compactação 4,37  $\pm$  1,18%, 4,41  $\pm$  1,21%, 4,09  $\pm$  1,77%, 4,47  $\pm$  1,11%, 3,92  $\pm$  0,83%, 3,28  $\pm$  2,12% e 3,94  $\pm$  1,04% maiores que o grupo controle para os tratamentos com 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs, respectivamente (Figura 7d).



Figura 6: Compactação Nuclear de células humanas tumorais e não tumorais. As linhagens (a) RPE-1, (b) BT-474, (c) MDA-MB-436 e (d) A673 foram cultivadas por 72h com concentrações entre 0 e 40  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 (Anova Two-way)



Figura 7: Compactação Nuclear de células humanas tumorais e não tumorais. As linhagens (a) RPE-1, (b) BT-474, (c) MDA-MB-436 e (d) A673 foram cultivadas por 72h com concentrações entre 0 e 12,5  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 (Anova Two-way)

# 5.1.4 Viabilidade celular

As linhagens RPE-1, BT-474, MDA-MB-436 tiveram a viabilidade celular avaliada após 24, 48 e 72h de tratamento com concentrações entre 0 e 40 µg/mL de AgCl-NPs (Figuras 8 e 9) ou concentrações entre 0 e 12,5 µg/mL Ag/AgCl-NPs (Figuras 10 e 11). Os resultados demonstraram que a viabilidade celular da linhagem não tumoral RPE-1 cultivada na condição controle por 24h foi de 94,20  $\pm$  3,47% (Figura 8a). Quando tratada pelo mesmo tempo com 2,5 e 10 µg/mL de AgCl-NPs estas células mantiveram a viabilidade celular igual à do grupo controle, porém viabilidades celulares significativamente maiores foram observadas quando as células foram tratadas com 5, 15, 20, 30 ou 40 µg/mL de AgCl-NPs, com aumentos de 4,32  $\pm$  4,78%, 5,61  $\pm$  4,26%, 4,36  $\pm$  4,48%, 4,68  $\pm$  4,62% e 3,72  $\pm$  4,71%, respectivamente, em relação grupo controle. Em 48h e 72h de tratamento com concentrações entre 2,5 e 40 µg/mL de AgCl-NP, as células da linhagem RPE-1 não apresentação alterações significativas na viabilidade celular em relação à condição controle, que nestes tempos apresentou viabilidade celular de 99,55  $\pm$  0,27% e 99,88  $\pm$  0,06%, respectivamente. A linhagem celular BT-474 apresentou viabilidade celular de 95,07  $\pm$  1,18% em 24h, 94,58  $\pm$  0,95% em 48h e de 97,13  $\pm$  0,67% em 72h, sem alterações significativas quando tratada com concentrações entre 2,5 e 20 µg/mL de AgCl-NP (Figura 8b). A viabilidade celular de BT-474, porém, foi reduzida quando estas células foram tratadas por 24, 48 ou 72h com 30 e 40 µg/mL de AgCl-NP, sendo que em 72h a redução na viabilidade em relação ao grupo controle chega a  $10,50 \pm 4,60\%$  para as células tratadas com 30 µg/mL e a  $64,19 \pm 11,28\%$  para as células tratadas 40 µg/mL de nanopartículas. A viabilidade celular da linhagem MDA-MB-436 em 24h foi de 97,77  $\pm$  1,43%, em 48 foi de 97,81  $\pm$  0,691% e em 72h foi de 97,86  $\pm$ 0,863% quando cultivada na condição controle (Figura 8c). O tratamento com 2,5 µg/mL de AgCl-NPs não afetou a viabilidade celular até 48h de tratamento, porém em 72h todas as concentrações de AgCl-NPs afetaram significativamente a viabilidade celular de MDA-MB-436, de modo que em 72h de tratamento as células tratadas com 2,5, 5, 10, 15, 20, 30, 40  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs apresentaram reduções de 4,13 ± 5,42%, 12,59 ± 2,15%, 22,95 ± 3,60%,  $30,92 \pm 1,89\%$ ,  $35,85 \pm 3,33\%$ ,  $43,88 \pm 2,78\%$  e  $46,19 \pm 3,38\%$  na viabilidade celular em relação ao grupo controle, respectivamente. As células da linhagem A673 cultivadas na condição controle apresentaram viabilidade celular de 72,27  $\pm$  2,93% em 24h, 70,03  $\pm$  3,42% em 48h e 79,24  $\pm$  7,65% em 72h e sofreram reduções significativas quando tratadas com qualquer concentração de AgCl-NPs nos três tempos avaliados (Figura 8d). Em 72h de tratamento, os grupos tratados com 2,5, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 µg/mL de AgCl-NPs sofreram reduções de  $25,39 \pm 10,68\%$ ,  $47,28 \pm 8,27\%$ ,  $55,33 \pm 8,82\%$ ,  $51,51 \pm 4,24\%$ ,  $58,22 \pm 4,82$ ,  $74,09 \pm 7,15 \text{ e } 99,17 \pm 0,76 \text{ na viabilidade celular, respectivamente.}$ 



Figura 8: Ensaio de viabilidade de células humanas tumorais e não tumorais. As linhagens (a) RPE-1, (b) BT-474, (c) MDA-MB-436 e (d) A673 foram cultivadas por 72h com concentrações entre 0 e 40  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 (Anova Two-way)



**Figura 9: Imagens representativas do ensaio viabilidade de células humanas tumorais (BT-474, MDA-MB-436 e A673) e não tumorais (RPE-1).** As imagens mostram em verde as células viáveis (coradas com calceína) e em vermelho as células não viáveis (coradas com EthD-1) após 72h de tratamento com concentrações entre 0 e 40 µg/mL de AgCl-NPs. As barras de escala equivalem a 200 µm.

As células da linhagem RPE-1 quando cultivadas por 24h com concentrações entre 0,5 e 10  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs não apresentaram alterações relevantes na viabilidade celular, mas quando cultivadas com 12,5  $\mu$ g/mL de nanopartículas apresentaram redução de 6,11 ± 3,60% na viabilidade celular (Figura 10a). Em 48h de cultivo, as células tratadas com 2,5 a 12,5  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs apresentaram reduções significativas na viabilidade celular, atingindo uma redução máxima de 10,74 ± 1,77% quando tratadas com a maior concentração de nanopartículas. Já em 72h somente o grupo de células cultivado com 10  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs apresentou viabilidade 5,68 ± 2,69% menor que o grupo controle, enquanto todos os outros tratamentos não induziram alterações significativas.

As células da linhagem BT-474 apresentaram viabilidade celular reduzida quando tratada por 24 e 48h com 10 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs (Figura 10b). Em 72h de cultivo, as células tratadas com concentrações entre 0,5 e 5 µg/mL de nanopartículas não apresentaram modificações relevantes na viabilidade celular, entretanto os grupos cultivados com 7,5, 10 e 12,5  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs sofreram reduções de 13,24  $\pm$  5,34%, 76,26  $\pm$ 10,58% e de 98,36 ± 1,12% na viabilidade celular, respectivamente. A linhagem MDA-MB-436 quando cultivada com concentrações entre 0,5 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs sofrem redução significativa na viabilidade celular tanto em 24, quanto em 48 e 72h de tratamento (Figura 10c). Em 72h estas células não tratadas apresentam viabilidade celular igual a 90,51  $\pm$ 1,23% e os grupos tratados com 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs apresentam reduções de  $18,89 \pm 3,85\%$ ,  $60,38 \pm 8,46\%$ ,  $72,68 \pm 4,32\%$ ,  $82,76 \pm 1,31\%$ , 82,83 $\pm$  2,01%, 82,12  $\pm$  2,04% e 82,29  $\pm$  1,67% na viabilidade celular, respectivamente. Resultado semelhante foi obtido para a linhagem celular A673 (Figura 10d), que também sofreu reduções significativas na viabilidade celular quando tratada por 24, 48 ou 72h com concentrações entre 0,5 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs chegando a reduções de 53,15 ±  $3,18\%, 45,62 \pm 3,19\%, 48,29 \pm 4,42\%, 71,94 \pm 3,56\%, 86,75 \pm 3,91\%, 92,56 \pm 2,33\%$  e 92,51  $\pm$  3,83% quando cultivada por 72h com 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs, respectivamente.



Figura 10: Ensaio de viabilidade de células humanas tumorais e não tumorais. As linhagens (a) RPE-1, (b) BT-474, (c) MDA-MB-436 e (d) A673 foram cultivadas por 72h com concentrações entre 0 e 12,5  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 (Anova Two-way)



**Figura 11: Imagens representativas do ensaio viabilidade de células humanas tumorais (BT-474, MDA-MB-436 e A673) e não tumorais (RPE-1).** As imagens mostram em verde as células viáveis (coradas com calceína) e em vermelho as células não viáveis (coradas com EthD-1) após 72h de tratamento com concentrações entre 0 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs. As barras de escala equivalem a 200 µm.

# 5.1.5 Apoptose

Para avaliar se o tratamento com nanopartículas induz apoptose nas células, estas foram marcadas com CellEvent<sup>®</sup>, que é um peptídeo de quatro aminoácidos conjugado a um fluoróforo que serve como substrato para caspase-3/7, que após clivado pela caspase se conjuga ao DNA e fluoresce. A Figura 12 mostra o resultado da avaliação do percentual de células apoptóticas na população das linhagens RPE-1, BT-474, MDA-MB-436 e A673 tratadas com AgCl-NPs. Os resultados demonstraram que as células da linhagem RPE-1, quando cultivadas por 24h na condição controle apresentam 0,46  $\pm$  0,71% de células apoptóticas, entretanto nos tempos 48 e 72h, o percentual de apoptose na população é de 0% (Figura 12a). Quanto tratadas por 24, 48 ou 72h com concentrações entre 2,5 e 30 µg/mL de AgCl-NPs, estas células não sofrem alterações estatisticamente significativas no percentual de apoptose, porém quando tratadas com 40 µg/mL de AgCl-NPs apresentam em 24h 3,46  $\pm$  2,32 % de apoptose na população, enquanto em 72h, o percentual é de 3,00  $\pm$  3,57%.

Em 24h de cultivo na condição controle, a linhagem BT-474 apresentou 2,85  $\pm$  2,87% de células apoptóticas na população e os tratamentos com concentrações até 30 µg/mL de AgCl-NPs não afetaram significativamente este valor, entretanto o tratamento com 40 µg/mL de AgCl-NPs elevou o percentual de células apoptóticas para 27,86  $\pm$  3,59% (Figura 12b). Em 48h o percentual de apoptose no grupo controle foi de 3,11  $\pm$  1,682%, aumentando para 9,82  $\pm$  5,29, 10,83  $\pm$  6,44 e 37,55  $\pm$  6,62% quando as células são tratadas com 10, 30 e 40 µg/mL de AgCl-NPs, respectivamente. Em 72h BT-474 cultivada na condição controle apresentou 1,48  $\pm$  1,12% de apoptose na população, sendo que este percentual não é significativamente modificado pelos tratamentos com até 30 µg/mL de AgCl-NPs, porém o tratamento com 40 µg/mL de AgCl-NPs elevou o percentual de apoptose para 22,54%  $\pm$  6,12%.

A linhagem MDA-MB-436 quando cultivada por 24h na condição controle apresentou  $3,15 \pm 1,91\%$  de apoptose na população. Neste tempo de cultivo os tratamentos com concentrações entre 2,5 e 40 µg/mL de AgCl-NPs não afetaram significativamente o percentual de apoptose na população (Figura 12c). Em 48h de tratamento, as células controle apresentaram  $1,41 \pm 1,30\%$  de células apoptóticas e este percentual é significativamente maior para todos os grupos tratados com nanopartículas, atingindo  $30,33 \pm 10,39\%$  de apoptose no grupo tratado com 40 µg/mL de AgCl-NPs. Em 72h o grupo controle apresentou  $0,42 \pm 0,66\%$  de células apoptóticas, não havendo alterações significativas nos grupos tratados com 2,5 ou 5 µg/mL de AgCl-NPs, entretanto os grupos cultivados com

concentrações superiores a 10  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs aumentaram significativamente o percentual de células apoptóticas na população, culminando em 20,02 ± 7,11% de células apoptóticas no grupo tratado com 40  $\mu$ g/mL.

Em 24h a condição controle da linhagem A673 apresentou 20,99  $\pm$  11,97% de células apoptóticas e tratamentos com concentrações maiores que 5 µg/mL de AgCl-NPs induziram aumento significativo no percentual de apoptose da população alcançando 46,69  $\pm$  6,27% no tratamento com 40 µg/mL (Figura 12d). Em 48h o grupo controle apresentou 11,01  $\pm$  5,11% de células apoptóticas e assim como em 24h, concentrações acima de 5 µg/mL de AgCl-NPs elevaram o percentual de apoptose na população, neste tempo de tratamento o grupo tratado com 40 µg/mL de nanopartículas atingiu 41,87  $\pm$  4,67% de células apoptóticas. Em 72h de tratamento as células da linhagem A673 cultivadas na condição controle apresentaram 11,43  $\pm$  4,14% de apoptose na população e o tratamento com concentrações a partir de 2,5 µg/mL de AgCl-NPs induziram aumento no percentual de apoptose, sendo o valor máximo igual a 47,23  $\pm$  7,23%, que foi atingido no tratamento com 20 µg/mL de nanopartículas.



Figura 12: Avaliação do percentual de células apoptóticas em linhagens tumorais e não tumorais. As linhagens (a) RPE-1, (b) BT-474, (c) MDA-MB-436 e (d) A673 foram cultivadas por 72h com concentrações entre 0 e 40  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 (Anova Two-way)

A figura 13 mostra os resultados da avaliação do percentual de células apoptóticas nas populações de células tratadas com Ag/AgCl-NPs. Em 24h de cultivo, a linhagem RPE-1 apresentou  $0,63 \pm 0,55\%$  de apoptose na população controle, enquanto aumentos significativos foram observados em tratamentos com concentrações acima de 2,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs, atingindo  $5,23 \pm 2,76\%$  de apoptose quando estas células foram cultivadas com 12,5 µg/mL de nanopartículas (Figura 13a). Em 48h de cultivo, tratamentos com 0,5, 5, 7,5, 10 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs elevaram o percentual de apoptose na população de células, chegado a  $5,17 \pm 1,81\%$  de células apoptóticas no tratamento com 12,5 µg/mL de nanopartículas. Em 72h de tratamento, somente as concentrações acima de 7,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs induziram aumento na apoptose celular, e mais uma vez o grupo tratado com 12,5 µg/mL apresentou o maior percentual de apoptose,  $3,51 \pm 0,91\%$ .

A linhagem BT-474 quando cultivada por 24h na condição controle apresentou 3,69 ± 3,10% de células apoptóticas na população, que é significativamente maior quando as células são tratadas com concentrações acima de 5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs, alcançando 51,41 ± 12,28 % de apoptose quando cultivada com 12,5 µg/mL de nanopartículas (Figura 13b). Em 48h o cultivo controle de BT-474 apresenta 1,62 ± 1,39% de apoptose na população, sem alterações estatisticamente significativas quando tratadas com concentrações de até 5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs, entretanto quando tratadas com 7,5, 10 ou 12,5 µg/mL, apresentaram percentuais de apoptose significativamente maiores: 51,74 ± 6,29%, 52,34 ± 8,44% e 64,66 ± 2,73%, respectivamente. Em 72h o cultivo controle apresentou 0,75 ± 0,58% de apoptose na população e assim como em 48h, os tratamentos com até 5 µg/mL de nanopartículas não modificaram significativamente este percentual, enquanto os tratamentos com concentrações acima de 7,5 µg/mL induziram aumento, atingindo um percentual máximo de apoptose igual a 51,01 ± 12,64%, quando tratada com 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs.

A linhagem MDA-MB-436 quando cultivada na condição controle por 24, 48 e 72h apresentou percentuais de apoptose iguais a  $3,06 \pm 1,51$ ,  $2,64 \pm 1,33\%$  e  $2,12 \pm 0,78\%$ , respectivamente (Figura 13c). Os tratamentos com concentrações entre 0,5 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs elevaram o percentual de apoptose em todos os tempos avaliados, sendo que os maiores percentuais de apoptose foram alcançados no tratamento com a maior concentração de nanopartículas, atingindo  $21,54 \pm 3,16\%$ ,  $27,03 \pm 3,70\%$  e  $31,05 \pm 1,57\%$  de apoptose, em 24, 48 e 72h, respectivamente.

Em 24h de cultivo na condição controle, a linhagem A673 apresentou percentual de apoptose igual a  $21,71 \pm 7,78\%$ , sofrendo aumentos significativos quando tratada com

concentrações acima de 2,5  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs (Figura 13d). Em 48 e 72h de tratamento, concentrações acima de 0,5  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs induziram aumento no percentual de apoptose na população, de modo que o maior percentual de apoptose em 48h foi 48,21  $\pm$  5,01%, alcançado quando as células foram tratadas com 12,5  $\mu$ g/mL de nanopartículas e em 72h foi 35,39  $\pm$  7,16%, atingido quando as células foram tratadas com 0,5  $\mu$ g/mL de nanopartículas.



Figura 13: Avaliação do percentual de células apoptóticas em linhagens tumorais e não tumorais. As linhagens (a) RPE-1, (b) BT-474, (c) MDA-MB-436 e (d) A673 foram cultivadas por 72h com concentrações entre 0 e 40  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 (Anova Two-way)

# 5.1.6 Produção de ROS

Para avaliar se as nanopartículas a base de prata induzem alguma alteração na produção de ROS, após 24, 48 e 72h de tratamento com AgCl-NPs ou Ag/AgCl-NPs, as células das linhagens RPE-1, BT-474, MDA-MB-436 e A673 foram marcadas com DHE, um indicador de super óxido que quando oxidado é transformado em EthD-1, intercala o DNA e fluoresce na região espectral do vermelho (Figuras 14 e 15). Os resultados demonstraram que ao serem tratadas por até 72h com concentrações entre 2,5 e 40 µg/mL de AgCl-NPs, células da linhagem RPE-1 não tiveram a produção de ROS alterada (Figura 14a). Entretanto, células

da linhagem BT-474, quando tratadas por 24h com 15, 20, 30 ou 40 µg/mL de AgCl-NPs apresentaram aumentos de  $61,23 \pm 23,96\%$ ,  $41,91 \pm 33,33\%$ ,  $70,98 \pm 24,54\%$  e  $213,98 \pm 66,91\%$ , respectivamente, na produção celular de ROS (Figura 14b). Em 48 e 72h de cultivo, somente o tratamento com 40 µg/mL de AgCl-NPs afetou a produção celular de ROS em BT-474, que apresentou aumentos de  $104,264 \pm 16,97\%$  e  $173,10 \pm 36,94\%$  a produção celular de ROS.

Em 24h a linhagem MDA-MB-436 apresentou aumento na concentração intracelular de ROS quando cultivada com concentrações acima de 5 µg/mL de AgCl-NPs. Em 48 e 72h, somente concentrações acima de 15 µg/mL de AgCl-NPs, induziram aumento significativo na concentração de ROS, em relação ao grupo controle (Figura 14c). Em relação ao grupo controle, o grupo tratado com 40 µg/mL de nanopartículas apresentou aumento na produção celular de ROS de 200,52  $\pm$  53,31% em 24h, 53,74  $\pm$  45,36% em 48h e 65,46  $\pm$  33,45% em 72h. As células da linhagem A673 apresentaram aumento significativo na produção de ROS quando cultivadas por 24h com concentrações acima de 5 µg/mL de AgCl-NPs, já em 48 e 72h, apresentaram aumento quando cultivadas com concentrações acima de 2,5 µg/mL de AgCl-NPs (Figura 14d). O tratamento de células da linhagem A673 com 40 µg/mL de AgCl-NPs induziu em 24h um aumento de 55,04  $\pm$  21,72% na produção de ROS, em 48h o aumento foi de 178,28  $\pm$  39,29% e em 72h 202,31  $\pm$  40,94%.



Figura 14: Avaliação da presença de ROS em linhagens tumorais e não tumorais. As linhagens (a) RPE-1, (b) BT-474, (c) MDA-MB-436 e (d) A673 foram cultivadas por 72h com concentrações entre 0 e 40  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 (Anova Two-way)

Quanto tratadas com concentrações entre 0,5 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs por 24, 48 ou 72h, células da linhagem RPE-1 não sofreram alterações na produção celular de ROS (Figura 15a), entretanto a linhagem BT-474 quando tratada com concentrações entre 7,5 e 12,5 µg/mL apresentou aumento significativo nos três tempos avaliados (Figura 15b). Sendo que em 72h a produção celular de ROS do grupo tratado com 7,5 µg/mL chega a ser 139,77%  $\pm$  127,34% maior que a do grupo controle, enquanto nos grupos tratados com 10 e 12,5 µg/mL, os aumentos são de 274,19  $\pm$  45,08% e 276,52  $\pm$  67,49%, respectivamente. Já a linhagem MDA-MB-436 apresentou aumentos significativos na produção celular de ROS quando cultivadas por 24, 48 e 72h com concentrações entre 0,5 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs, atingindo o máximo de ROS quando cultivada por 72h com 12,5 µg/mL, condição em que apresentou aumento de 141,36  $\pm$  42,82% em relação ao grupo controle (Figura 15c).

As células da linhagem A673 apresentaram aumentos significativos na produção celular de ROS quando tratados por 24 com 0,5, 1, 2,5, 10 e 12,5  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs, de modo que as células tratadas com 5 e 7,5  $\mu$ g/mL, não apresentaram aumentos significativos em relação ao grupo controle (Figura 15d). Já em 48 e 72h de tratamento, todas as concentrações avaliadas entre 0,5 e 12,5  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs induziram aumentos

significativos na produção celular de ROS, de modo que nos tempos a maior concentração de ROS foi obtida no tratamento com 12,5  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs. Nesta condição a produção celular de ROS foi 204,20 ± 18,72% maior que o controle em 48h e 136,29 ± 26,11% maior que o controle em 72h.



**Figura 15:** Avaliação da presença de ROS em linhagens tumorais e não tumorais. As linhagens (a) RPE-1, (b) BT-474, (c) MDA-MB-436 e (d) A673 foram cultivadas por 72h com concentrações entre 0 e 12,5  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 (Anova Two-way)

# 5.1.7 Avaliação multiparamétrica de citotoxicidade

Além de avaliar os efeitos das nanopartículas na proliferação, viabilidade, apoptose e produção de espécies reativas de oxigênio em 24, 48 e 72h, foram feitas ainda avaliações de outros parâmetros que podem ser indicadores da citotoxicidade das nanopartículas nas células. Após 48h de tratamento com diferentes concentrações de nanopartículas as células das linhagens RPE-1, BT-474, MDA-MB-436 e A673 foram coradas com LysoTracker®, para marcação de lisossomos; TMRM, um indicador de potencial de membrana mitocondrial; CellMask<sup>™</sup> para marcar a membrana citoplasmática e Rodamina-faloidina, para marcação de microfilamentos de actina. As Figuras 16 e 17 mostram imagens representativas de células da linhagem RPE-1, tratadas por 48h com concentrações entre 0 e 40 µg/mL de AgCl-NPs e 0 e

12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs, respectivamente. A figura 18 apresenta imagens representativas de células da linhagem BT-474 tratada por 48h com concentrações entre 0 e 40 µg/mL de AgCl-NPs, enquanto a Figura 19 apresenta a mesma linhagem tratada por 48h com concentrações entre 0 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs. Na Figura 20 são exibidas imagens representativas de células da linhagem MDA-MB-436 tratada por 48h com concentrações entre 0 e 40 µg/mL de AgCl-NPs e a Figura 21 apresenta imagens representativas da mesma linhagem tratada por 48h com concentrações entre 0 e 40 µg/mL de AgCl-NPs e a Figura 21 apresenta imagens representativas da mesma linhagem tratada por 48h com concentrações entre 0 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs. As Figuras 22 e 23 mostram imagens representativas de células da linhagem A673, tratadas por 48h com concentrações entre 0 e 40 µg/mL de AgCl-NPs e 0 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs, respectivamente. As imagens foram obtidas utilizando um sistema de análise celular de alto conteúdo e segmentadas para quantificação ou obtenção de intensidade de fluorescência de objetos de interesse, permitindo uma avaliação quantitativa dos fenômenos observados nas imagens.



**Figura 16: Imagens de representativas da linhagem RPE-1 expostas por 48h a concentrações entre 0 e 40 μg/mL de AgCI-NPs.** As imagens foram adquiridas utilizando um sistema de análise celular de alto conteúdo para avaliar o dano nos lisossomos corados com LysoTracker Red (verde); o potencial de membrana mitocondrial, utilizando o corante TMRM (Vermelho); a área das células através da marcação de membranas utilizando o corante CellMask (vermelho); e os microfilamentos de actina corados com Rodamina-faloidina (vermelho). Em azul são exibidos os núcleos celulares corados com Hoechst ou DAPI. As barras de escala equivalem a 50 μm.



**Figura 17: Imagens de representativas da linhagem RPE-1 expostas por 48h a concentrações entre 0 e 12,5 μg/mL de Ag/AgCI-NPs.** As imagens foram adquiridas utilizando um sistema de análise celular de alto conteúdo para avaliar o dano nos lisossomos corados com LysoTracker Red (verde); o potencial de membrana mitocondrial, utilizando o corante TMRM (Vermelho); a área das células através da marcação de membranas utilizando o corante CellMask (vermelho); e os microfilamentos de actina corados com Rodamina-faloidina (vermelho). Em azul são exibidos os núcleos celulares corados com Hoechst ou DAPI. As barras de escala equivalem a 50 μm.



Figura 18: Imagens de representativas da linhagem tumoral BT-474 expostas por 48h a concentrações entre 0 e 40  $\mu$ g/mL de AgCI-NPs. As imagens foram adquiridas utilizando um sistema de análise celular de alto conteúdo para avaliar o dano nos lisossomos corados com LysoTracker Red (verde); o potencial de membrana mitocondrial, utilizando o corante TMRM (Vermelho); a área das células através da marcação de membranas utilizando o corante CellMask (vermelho); e os microfilamentos de actina corados com Rodamina-faloidina (vermelho). Em azul são exibidos os núcleos celulares corados com Hoechst ou DAPI. As barras de escala equivalem a 50  $\mu$ m.



**Figura 19: Imagens de representativas da linhagem tumoral BT-474 expostas por 48h a concentrações entre 0 e 12,5 μg/mL de Ag/AgCl-NPs.** As imagens foram adquiridas utilizando um sistema de análise celular de alto conteúdo para avaliar o dano nos lisossomos corados com LysoTracker Red (verde); o potencial de membrana mitocondrial, utilizando o corante TMRM (Vermelho); a área das células através da marcação de membranas utilizando o corante CellMask (vermelho); e os microfilamentos de actina corados com Rodamina-faloidina (vermelho). Em azul são exibidos os núcleos celulares corados com Hoechst ou DAPI. As barras de escala equivalem a 50 μm.



**Figura 20:** Imagens de representativas da linhagem tumoral MDA-MB-436 expostas por 48h a concentrações entre 0 e 40 μg/mL de AgCI-NPs. As imagens foram adquiridas utilizando um sistema de análise celular de alto conteúdo para avaliar o dano nos lisossomos corados com LysoTracker Red (verde); o potencial de membrana mitocondrial, utilizando o corante TMRM (Vermelho); a área das células através da marcação de membranas utilizando o corante CellMask (vermelho); e os microfilamentos de actina corados com Rodamina-faloidina (vermelho). Em azul são exibidos os núcleos celulares corados com Hoechst ou DAPI. As barras de escala equivalem a 50 μm.


**Figura 21: Imagens de representativas da linhagem tumoral MDA-MB-436 expostas por 48h a concentrações entre 0 e 12,5 μg/mL de Ag/AgCl-NPs.** As imagens foram adquiridas utilizando um sistema de análise celular de alto conteúdo para avaliar o dano nos lisossomos corados com LysoTracker Red (verde); o potencial de membrana mitocondrial, utilizando o corante TMRM (Vermelho); a área das células através da marcação de membranas utilizando o corante CellMask (vermelho); e os microfilamentos de actina corados com Rodamina-faloidina (vermelho). Em azul são exibidos os núcleos celulares corados com Hoechst ou DAPI. As barras de escala equivalem a 50 μm.



Figura 22: Imagens de representativas da linhagem tumoral A673 expostas por 48h a concentrações entre 0 e 40  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs. As imagens foram adquiridas utilizando um sistema de análise celular de alto conteúdo para avaliar o dano nos lisossomos corados com LysoTracker Red (verde); o potencial de membrana mitocondrial, utilizando o corante TMRM (Vermelho); a área das células através da marcação de membranas utilizando o corante CellMask (vermelho); e os microfilamentos de actina corados com Rodamina-faloidina (vermelho). Em azul são exibidos os núcleos celulares corados com Hoechst ou DAPI. As barras de escala equivalem a 50  $\mu$ m.



**Figura 23: Imagens de representativas da linhagem tumoral A673 expostas por 48h a concentrações entre 0 e 12,5 μg/mL de Ag/AgCl-NPs.** As imagens foram adquiridas utilizando um sistema de análise celular de alto conteúdo para avaliar o dano nos lisossomos corados com LysoTracker Red (verde); o potencial de membrana mitocondrial, utilizando o corante TMRM (Vermelho); a área das células através da marcação de membranas utilizando o corante CellMask (vermelho); e os microfilamentos de actina corados com Rodamina-faloidina (vermelho). Em azul são exibidos os núcleos celulares corados com Hoechst ou DAPI. As barras de escala equivalem a 50 μm.

### 5.1.7.1 Acidificação lisossomal

Após 48h de tratamento com diferentes concentrações de nanopartículas (AgCl-NPs ou Ag/AgCl-NPs), as células foram marcadas com o corante acidofílico LysoTracker<sup>®</sup>, cuja intensidade de fluorescência foi utilizada para estimar alterações na acidez lisossomal, um indicador de dano nesta organela. Os resultados obtidos revelaram que células da linhagem não tumoral RPE-1, quando tratadas com até 40 µg/mL de AgCl-NPs, não sofreram alterações significativas na intensidade de fluorescência do LysoTracker<sup>®</sup>, indicando que nesta linhagem celular o tratamento não induziu modificações na acidificação lisossomal (Figura 24a). A linhagem BT-474, não sofreu modificações significativas na acidificação lisossomal quando tratada com até 30 µg/mL de AgCl-NPs, entretanto quando tratada com 40 µg/mL de nanopartículas, células desta linhagem apresentaram redução de 13,19 ± 11,48% na intensidade de fluorescência do LysoTracker®, indicando redução na acidificação lisossomal (Figura 24b). Assim como a linhagem RPE-1, as células da linhagem MDA-MB-436 não apresentaram alterações na acidificação lisossomal quando tratadas com até 40 µg/mL de AgCl-NPs (Figura 24c). Já as células da linhagem A673, não sofrem alterações na acidificação lisossomal quando cultivadas com até 30 µg/mL de AgCl-NPs, porém quando tratadas com 40 µg/mL apresentaram redução de 60,62 ± 44,10% na intensidade de fluorescência do LysoTracker<sup>®</sup>, indicando redução na acidificação lisossomal (Figura 24d).

O tratamento com concentrações até 12,5  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs não afetou a acidificação lisossomal das linhagens RPE-1 (Figura 25a), MDA-MB-436 (Figura 25c) ou A673 (Figura 25d). Entretanto a linhagem BT-474 apesar de não sofrer alterações na acidificação lisossomal quando cultivada com até 10  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs, apresentou redução de 88,54  $\pm$  28,07% na intensidade de fluorescência do LysoTracker<sup>®</sup>, portanto redução na acidez dos lisossomos, quando tratada com 12,5  $\mu$ g/mL (Figura 25b).



Figura 24: Avaliação da intensidade de fluorescência de lisossomos em linhagens tumorais e não tumorais. As linhagens (a) RPE-1, (b) BT-474, (c) MDA-MB-436 e (d) A673 foram cultivadas por 48h com concentrações entre 0 e 40  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 (Anova One-way)



Figura 25: Avaliação da intensidade de fluorescência de lisossomos em linhagens tumorais e não tumorais. As linhagens (a) RPE-1, (b) BT-474, (c) MDA-MB-436 e (d) A673 foram cultivadas por 48h com concentrações entre 0 e 12,5  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 (Anova One-way)

#### 5.1.7.2 Potencial de membrana mitocondrial

Para avaliar se os tratamentos com nanopartículas induzem perda no potencial de membrana mitocondrial, após 48h de tratamento com concentrações entre 0 e 40 µg/mL de AgCl-NPs (Figura 26) ou concentrações entre 0 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs (Figura 27), as células das linhagens RPE-1, BT-474, MDA-MB-436 e A673 foram marcadas com TMRM, que é um fluorocromo capaz de infiltrar em células e de se acumular somente no interior de mitocôndrias ativas e com potencial de membrana íntegro. Ou seja, caso as mitocôndrias tenham perdido o gradiente de voltagem na membrana mitocondrial e consequentemente, sua função de produção de ATP, elas não são marcadas com o TMRM. Após a marcação das células com TMRM, foi feita uma quantificação do percentual da população que apresentou mitocôndrias marcadas pelo corante, ou seja, o percentual da população que ainda mantinha o potencial de membrana mitocondrial. Os resultados revelaram que o tratamento com concentrações entre 0 e 40 µg/mL de AgCl-NPs não afetou o potencial de membrana mitocondrial de células da linhagem RPE-1 (Figura 26a). Células da linhagem tumoral BT-474, apesar de não sofrerem alterações no potencial de membrana mitocondrial quando tratadas com concentrações até 30 µg/mL de AgCl-NPs, quando tratadas com 40  $\mu$ g/mL apresentaram redução de 7,12  $\pm$  4,35% no percentual de células com mitocôndrias saudáveis (Figura 26b). Células da linhagem MDA-MB-436 apresentaram redução no percentual de células com potencial de membrana mitocondrial íntegro quando tratadas com concentrações acima de 5 µg/mL de AgCl-NPs, apresentando redução máxima de 76,44  $\pm$  6,11% quando tratada com 40 µg/mL (Figura 26c). As células da linhagem A673, quando tratadas com AgCl-NPs sofrem redução dose dependente no percentual de células com potencial de membrana mitocondrial íntegro, atingindo redução de 99,01 ± 0,8% no percentual da população que apresenta mitocôndrias íntegras, quando tratadas com 40 µg/mL de AgCl-NPs (Figura 26d).



Figura 26: Avaliação do percentual de células que perderam o potencial de membrana mitocondrial. As linhagens (a) RPE-1, (b) BT-474, (c) MDA-MB-436 e (d) A673 foram cultivadas por 48h com concentrações entre 0 e 40  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 (Anova One-way)

Quando tratadas com concentrações entre 0 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs, células da linhagem RPE-1 não tiveram o potencial de membrana mitocondrial afetado (Figura 27a), já células da linhagem BT-474 quando tratadas com 10 e 12,5 µg/mL de nanopartículas apresentam reduções de 71,53  $\pm$  30,82 e 98,24  $\pm$  0,61%, respectivamente, no percentual da população com potencial de membrana mitocondrial íntegro (Figura 27b). A linhagem MDA-MB-436 apresentou reduções no percentual da população com potencial de membrana mitocondrial íntegro quando tratada com concentrações acima de 1 µg/mL de Ag/AgCl-NPs, culminando numa redução de 41,38  $\pm$  8,67% quando tratada com 40 µg/mL de nanopartículas (Figura 27c). A linhagem A673 sofreu perda no potencial de membrana mitocondrial da população em tratamentos com 0,5 a 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs, sendo que no tratamento com 12,5 µg/mL 99,21  $\pm$  1,41% da população apresentou perda do potencial de membrana mitocondrial (Figura 27d).



Figura 27: Avaliação do percentual de células que perderam o potencial de membrana mitocondrial. As linhagens (a) RPE-1, (b) BT-474, (c) MDA-MB-436 e (d) A673 foram cultivadas por 48h com concentrações entre 0 e 12,5  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 (Anova One-way)

#### 5.1.7.3 Microfilamentos de actina

Para avaliar se os tratamentos com nanopartículas a base de prata eram capazes de induzir alterações no estado de polimerização de microfilamentos de actina, após os tratamentos as células foram fixadas, permeabilizadas e coradas com rodamina-faloidina, um marcador que tem alta afinidade com F-actina. A intensidade de fluorescência deste marcador foi utilizada como indicador de alterações na polimerização de actina. Os resultados obtidos revelaram que tratamentos com concentrações entre 2,5 e 40 µg/mL de AgCl-NPs não induziram alterações significativas na polimerização de actina das células RPE-1 (Figura 28a), BT-474 (Figura 28b), MDA-MB-436 (Figura 28c) ou A673 (Figura 28d). O mesmo fenômeno foi observado nos tratamentos com concentrações entre 0,5 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs, nas células RPE-1 (Figura 29a), MDA-MB-436 (Figura 29c) ou A673 (Figura 29d), entretanto a linhagem celular BT-474 apresentou redução na intensidade de fluorescência de rodamina-faloidina quando tratada com concentrações acima de 1 µg/mL de nanopartículas, sendo que no tratamento com 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs a redução foi de 85,05  $\pm$  9,06%, indicando que nessas condições houve redução na polimerização de microfilamentos de actina (Figura 29d).



**Figura 28:** Avaliação da intensidade de fluorescência de microfilamentos de actina de linhagens tumorais e não tumorais. As linhagens (a) RPE-1, (b) BT-474, (c) MDA-MB-436 e (d) A673 foram cultivadas por 48h com concentrações entre 0 e 40 μg/mL de AgCl-NPs. (Anova One-way)



Figura 29: Avaliação da intensidade de fluorescência de microfilamentos de actina de linhagens tumorais e não tumorais. As linhagens (a) RPE-1, (b) BT-474, (c) MDA-MB-436 e (d) A673 foram cultivadas por 48h com concentrações entre 0 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs. (Anova One-way)

## 5.1.7.4 Área celular

Para avaliar o efeito das nanopartículas na área das células, estas foram tratadas por 48h com concentrações entre 0 e 40 µg/mL de AgCl-NPs ou concentrações entre 0 e 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs e foram coradas com o marcador de membranas CellMask<sup>TM</sup>. Após a obtenção das imagens de fluorescência, foi feita no software de análise de imagens a segmentação das membranas e medição da área das células. Os resultados revelaram que as áreas médias das células das linhagens RPE-1 (Figura 30a), BT-474 (Figura 30b) e MDA-MB-436 (Figura 30c) quando cultivadas na condição controle são 809,99 ± 52,61, 477,56 ± 19,82, e 485,75 ± 45,44 µm<sup>2</sup>, respectivamente. A área celular dessas linhagens não foi significativamente afetada quando as células foram tratadas com até 40 µg/mL de AgCl-NPs. A linhagem A673 apresentou área celular média igual a 607,98 ± 65,26 µm<sup>2</sup> quando cultivada na condição controle, sem alterações significativas quando tratada com até 30 µg/mL de AgCl-NPs (Figura 30d). Entretanto, quanto foi tratada com 40 µg/mL de AgCl-NPs, a linhagem A673 apresentou redução de 22,96 ± 17,99% na área celular, apresentando nesta condição uma área média de 461,67 ± 93,01 µm<sup>2</sup>.

Quanto tratadas com até 12,5  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs, não houve alteração significativa na área celular de nenhuma das linhagens (Figura 31). Neste tratamento, as linhagens RPE-1 (Figura 31a), BT-474 (Figura 31b), MDA-MB-436 (Figura 31c) e A673 (Figura 31d) apresentaram na condição controle áreas iguais a 764,44 ± 44,45, 526,55 ± 10,92, 453,32 ± 28,58 e 552,88 ± 73,16  $\mu$ m<sup>2</sup>, respectivamente.



**Figura 30:** Avaliação da área celular de linhagens tumorais e não tumorais. As linhagens (a) RPE-1, (b) BT-474, (c) MDA-MB-436 e (d) A673 foram cultivadas por 48h com concentrações entre 0 e 40  $\mu$ g/mL de AgCl-NPs. (Anova One-way)



Figura 31: Avaliação da área celular de linhagens tumorais e não tumorais. As linhagens (a) RPE-1, (b) BT-474, (c) MDA-MB-436 e (d) A673 foram cultivadas por 48h com concentrações entre 0 e 12,5  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs. (Anova One-way)

As tabelas 5 e 6, sumarizam os efeitos da exposição à AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs, respectivamente, na proliferação, viabilidade, percentual de apoptose na população, produção celular de ROS, condensação nuclear, dano lisossomal, potencial de membrana mitocondrial, microfilamentos e a área celular de células das linhagens RPE-1, BT-474, MDA-MB-436 e A673.

Tabela 5: Síntese dos principais efeitos de AgCl-NPs nas linhagens celulares RPE-1, BT-474, MDA-MB-436 e A673. Onde os símbolos  $\uparrow$ ,  $\uparrow\uparrow$  e  $\uparrow\uparrow\uparrow$  indicam aumentos pequenos, médios e grandes, respectivamente;  $\downarrow$ ,  $\downarrow\downarrow$  e  $\downarrow\downarrow\downarrow$  indicam reduções pequenas, médias e grandes, respectivamente; e o símbolo - indica ausência de alterações significativas.

Parâmetros	RPE-1	<b>BT-474</b>	MDA-MB-436	A673
Proliferação	-	$\downarrow$	$\downarrow \downarrow \downarrow$	$\downarrow \downarrow \downarrow$
Viabilidade	-	$\downarrow$	$\downarrow \downarrow \downarrow$	$\downarrow \downarrow \downarrow$
Apoptose	1	$\uparrow \uparrow$	$\uparrow \uparrow \uparrow$	$\uparrow\uparrow\uparrow$
Produção de ROS	-	1	$\uparrow \uparrow$	$\uparrow\uparrow\uparrow$
Condensação nuclear	$\uparrow \uparrow$	1	↑	$\uparrow\uparrow\uparrow$
Dano lisossomal	-	-	-	-
Potencial mitocondrial	-	$\downarrow$	$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$	$\downarrow \downarrow \downarrow$

Microfilamentos	-	-	-	-
Área da célula	-	-	-	$\downarrow$

Tabela 6: Síntese dos principais efeitos de Ag/AgCl-NPs nas linhagens celulares RPE-1, BT-474, MDA-MB-436 e A673. Onde os símbolos  $\uparrow$ ,  $\uparrow\uparrow$  e  $\uparrow\uparrow\uparrow$  indicam aumentos pequenos, médios e grandes, respectivamente;  $\downarrow$ ,  $\downarrow\downarrow$  e  $\downarrow\downarrow\downarrow$  indicam reduções pequenas, médias e grandes, respectivamente; e o símbolo - indica ausência de alterações significativas.

Parâmetros	RPE-1	<b>BT-474</b>	MDA-MB-436	A673
Proliferação	$\downarrow$	-	$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$	$\downarrow \downarrow \downarrow$
Viabilidade	$\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$	$\downarrow \downarrow \downarrow$
Apoptose	1	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow \uparrow \uparrow$	$\uparrow\uparrow\uparrow$
Produção de ROS	-	$\uparrow \uparrow$	$\uparrow \uparrow \uparrow$	$\uparrow \uparrow \uparrow$
Condensação nuclear	1	$\uparrow\uparrow$	-	$\uparrow \uparrow \uparrow$
Dano lisossomal	-	$\downarrow$	-	-
Potencial mitocondrial	-	Ļ	$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$
Microfilamentos	-	Ļ	-	-
Área da célula	-	-	-	-

# 5.2 Avaliação dos efeitos da exposição à Ag/AgCl-NPs na morfologia de células tumorais e não tumorais

## 5.2.1 Avaliação da viabilidade celular e determinação da concentração de Ag/AgCl-NPs para ensaios morfológicos

Para avaliar o efeito da exposição a doses subletais de Ag/AgCl-NPs na morfologia e ultraestrutura de células tumorais, utilizamos a linhagem MDA-MB-468 de adenocarcinoma mamário triplo negativo derivada de sítio metastático e para avaliar sua seletividade foi utilizada a linhagem não tumoral HFF-1 (Fibroblasto de prepúcio humano). Para escolher uma concentração subletal de Ag/AgCl-NPs para realização das análises morfológicas a determinação da viabilidade celular foi feita por meio de um teste colorimétrico simples utilizando o corante vital MTS ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólico), que por ação de enzimas desidrogenases encontradas em células metabolicamente ativas é reduzido à formazan, solúvel em meio aquoso e que pode ser medido por absorbância a 490 nm, de modo que a absorbância medida é diretamente

proporcional ao número de células vivas em cultura. A análise da viabilidade foi feita após 48h de tratamento com concentrações entre 0 e 40 µg/mL de Ag/AgCl-NPs. Os resultados obtidos mostraram que a linhagem HFF-1 mantida por 48h na condição controle apresentou viabilidade de  $100 \pm 1,9\%$  (Figura 32a). Tratamentos com 1 ou 5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs não alteram significativamente a viabilidade da linhagem HFF-1, entretanto quando tratada com 2,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs a viabilidade foi 31% menor, em relação ao controle. Tratamentos com concentrações superiores a 10 µg/mL também reduzem significativamente a viabilidade de 70% quando expostas à 40 µg/mL de nanopartículas.

A linhagem MDA-MB-468 cultivada na condição controle por 48h apresentou viabilidade celular de  $100 \pm 3,2\%$  (Figura 32b) e quando exposta aos tratamentos com 1 a 40 µg/mL de Ag/AgCl-NPs apresentou reduções significativas na viabilidade atingindo 55% quando submetidas a tratamentos com 40 µg/mL. Com base nos dados obtidos no ensaio de viabilidade, foram calculados os valores de IC<sub>50</sub> para cada uma das células. O IC<sub>50</sub> obtido para a linhagem HFF-1 foi de 3,87 µg/mL e para a linhagem MDA-MB-468 foi de 2,19 µg/mL, sendo 58,56% menor do que a da linhagem não tumoral, demonstrando que as nanopartículas são mais citotóxicas para as células tumorais. Assim, para as avaliações dos efeitos morfológicos da exposição à Ag/AgCl-NPs foi determinado a utilização de 2,2 µg/mL de Ag/AgCl-NPs.



**Figura 32: Ensaio de viabilidade de células humanas tumorais e não tumorais.** As linhagens (a) HFF-1 e (b) MDA-MB-468 foram cultivadas por 48h com concentrações entre 0 e 40  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs. \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 (Anova One-way)

### 5.2.2 Avaliação dos efeitos da exposição à Ag/AgCl-NPs na superfície celular

Para avaliar se a exposição à Ag/AgCl-NPs é capaz de induzir alterações na morfologia da superfície celular as linhagens celulares HFF-1 e MDA-MB-468 foram cultivadas por 48h na condição controle ou tratadas com 2,2 µg/mL de AgCl-NPs e analisadas por MEV. Os resultados obtidos demonstraram que a linhagem HFF-1 na condição controle apresenta morfologia uniforme, e algumas projeções apicais de membrana (Figuras 33a e 33b), porém quando expostas por 48h à nanopartículas, essas células passam a apresentar numerosas projeções de membrana (Figuras 33c e 33d).

A linhagem tumoral MDA-MB-468 mantida na condição controle (Figuras 34a e 34b) apresentou morfologia heterogênea, como algumas células bem espraiadas e aderidas ao substrato e outras mais esféricas. As células apresentaram ainda numerosos prolongamentos de membrana. Quando expostas às nanopartículas, as células tumorais MDA-MB-468 não apresentam morfologia com diferenças notáveis em relação ao grupo controle, de modo que também apresentaram morfologia heterogênea e numerosos prolongamentos de membrana



(Figuras 34c e 34d). Dentre as células MDA-MB-468 tratadas foram encontradas ainda algumas células com morfologia tipicamente apoptótica, como representado na figura 34d.

**Figura 33: Microscopia eletrônica de varredura.** Células da linhagem HFF-1 cultivadas na condição controle (**a**); imagem em maior aumento de uma célula controle (**b**); HFF-1 tratada com 2,2 µg/mL de Ag/AgCl-NPs (**c**); e um maior aumento de uma células HFF-1 tratada com 2,2 µg/mL de Ag/AgCl-NPs (**d**).



**Figura 34:** Microscopia eletrônica de varredura. Células da linhagem tumoral MDA-MB-468 cultivadas na condição controle (a); imagem em maior aumento de uma célula controle (b) e células tratadas com 2,2  $\mu$ g/mL de Ag/AgCl-NPs (c e d).

### 6. Discussão

Para a realização deste trabalho foram utilizados dois tipos de nanopartículas a base de prata previamente descritas pelo grupo: Ag/AgCl-NPs (EUGENIO *et al.*, 2016) e AgCl-NPs (FERREIRA *et al.*, 2017). As AgCl-NPs foram produzidas biologicamente utilizando o sobrenadante do cultivo de microalgas da espécie *Chlorella vulgaris* e caraterizadas por Energia Dispersiva de Raios X (EDS) confirmando a presença de átomos de cloro e prata na composição das nanopartículas; Difração de Raios X (DRX) demonstrando que as nanopartículas possuem estrutura cristalina característica de AgCl-NPs e por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), demonstrando que as nanopartículas possuem formato

majoritariamente esférico, diâmetros que variam entre 1,6 e 34,4nm e diâmetro médio de 9,8  $\pm$  5,7 nm (FERREIRA *et al.*, 2017). As Ag/AgCl-NPs foram sintetizadas biologicamente por leveduras da espécie *Candida lusitaniae* e a caracterização destas nanopartículas foi feita por meio de: EDS, que confirmou a presença de átomos de cloro e prata na composição das nanopartículas; DRX, que demonstrou que as nanopartículas possuem planos cristalinos característicos Ag que coexistem com planos cristalinos de AgCl, o que é característico de Ag/AgCl-NPs e por TEM, demonstrando que as nanopartículas possuem formato majoritariamente esférico, diâmetros que variam entre 2 e 22 nm e diâmetro médio igual a 6,9 ± 4,5 nm (EUGENIO *et al.*, 2016).

As nanopartículas de prata, são atualmente o nanomaterial mais utilizado na indústria e isto se deve principalmente à sua atividade antimicrobiana. AgNPs compartilham diversas características com as nanopartículas a base de prata, como AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs, como por exemplo, a capacidade de liberação de íons  $Ag^+$ , característica que influencia diretamente no efeito citotóxico das nanopartículas contra microrganismos e células de organismos multicelulares (REIDY *et al.*, 2013). Apesar disso, estas nanopartículas não tiveram suas aplicações biomédicas extensamente estudadas, de modo que são necessários estudos para avaliar seus efeitos em diversos tipos de organismos e células, uma vez que os estudos realizados até o momento estão limitados a avaliações muito simples dos efeitos antibacterianos e antifúngicos.

O presente trabalho avaliou o potencial citotóxico e antitumoral de AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs contra células humanas, com o intuito de explorar os mecanismos pelos quais as células são afetadas pelas nanopartículas a base de prata. Para avaliação da citotoxicidade foi utilizada a linhagem não-tumoral RPE-1, uma linhagem epitelial proveniente do epitélio pigmentado da retina. Para avaliação do potencial antitumoral foram utilizadas três linhagens tumorais: BT-474, MDA-MB-436 e A673. As linhagens BT-474 e MDA-MB-436 são linhagens provenientes de adenocarcinomas mamários, entretanto a segunda é do tipo triplonegativo, já a linhagem A673 é proveniente de um tumor ósseo, o sarcoma de Ewing.

A literatura mostra que células tumorais tratadas com nanopartículas de prata apresentam redução na taxa de crescimento, bem como na viabilidade celular. Células MCF-7 por exemplo, quando tratadas com AgNPs biologicamente produzidas utilizando extrato de figo (*Ficus carica*) apresentam significativa redução na viabilidade celular (JACOB *et al.*, 2017). Células de adenocarcinoma gástrico (AGS) tratadas com concentrações entre 5 e 20 µg/mL de Ag/AgCINPs produzidas biologicamente utilizando extrato de *Sasa borealis* 

apresentaram redução dose-dependente na viabilidade celular e alterações na morfologia celular e nuclear, incluindo a fragmentação e condensação do DNA (PATIL et al., 2017). Alguns trabalhos mostram ainda que células de diferentes linhagens podem responder de forma diferente à tratamentos com nanopartículas, como demonstrado por GONZÁLEZ-BALLESTEROS et al., (2019) utilizando as linhagens Caco-2 e HT-29 de câncer colorretal e as linhagens não tumorais PCS-201-010 (células primárias de fibroblasto dérmico de recémnascido) e CCD-112CoN (fibroblasto de cólon humano) que foram tratadas com concentrações entre 10,63 a 170 µM de AgNP produzidas biologicamente utilizando extrato da macroalga Ulva lactuca. Os resultados obtidos pelo grupo mostraram que o tratamento com AgNPs induziu forte redução na viabilidade celular da linhagem HT-29 chegando a um IC<sub>50</sub> de 13µM, na linhagem Caco-2 a redução na viabilidade celular chega a apenas 20%, mesmo na dose mais alta, a linhagem CCD-112CoN apresentou redução significativa na viabilidade celular apenas quando tratada com 170 µM de AgNP, enquanto a linhagem não PCS-201-010 não tem a viabilidade afetada pelo tratamento (GONZÁLEZtumoral BALLESTEROS et al., 2019). No presente trabalho também observamos efeitos diferentes dentre as linhagens avaliadas e os resultados obtidos revelaram que os tratamentos com nanopartículas à base de prata não induziram alterações significativas na taxa de crescimento celular da linhagem RPE-1, exceto quando exposta à concentração mais alta de Ag/AgCl-NPs (12,5 µg/mL) onde apresentou ligeira redução no crescimento. Essa linhagem não tumoral não sofreu prejuízos na viabilidade celular quando tratada com AgCl-NPs e apresenta ligeira redução na viabilidade quando tratada por 24h com 12,5 µg/mL ou por 48h com concentrações superiores a 2,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs, entretanto a viabilidade é restabelecida a níveis semelhantes ao grupo controle em 72h. A linhagem BT-474 não tem a taxa de crescimento celular modificada pelos tratamentos, entretanto é importante notar que a taxa de crescimento apresentada pelo grupo controle é baixa e que mesmo não sofrendo modificações no crescimento celular, a viabilidade é celular foi reduzida em tratamentos com concentrações superiores a 30 µg/mL de AgCl-NPs e concentrações acima de 7,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs. Por outro lado, as células das linhagens MDA-MB-436 e A673 apresentam notáveis reduções na taxa de crescimento e viabilidade celular, mesmo quando tratadas com as mais baixas concentrações de nanopartículas, ou seja 2,5 µg/mL de AgCl-NPs ou 0,5  $\mu g/mL$  de Ag/AgCl-NPs.

Na literatura ainda não se encontra grande variedade de trabalhos avaliando o efeito antitumoral de AgCl-NPs ou Ag/AgCl-NPs, entretanto trabalhos mostram que os efeitos

tóxicos de AgNPs são mediados pela liberação de íons  $Ag^+$  (LOZA *et al.*, 2014) e as nanopartículas de AgCl e Ag/AgCl (DHAS *et al.*, 2014) possuem também a capacidade de liberação de íons de prata em solução, indicando que os mecanismos de toxicidade podem ser semelhantes. Os íons de prata são capazes de induzir a apoptose em células tumorais, como demonstrado por KAPLAN *et al.*, (2017), que expôs células de adenocarcinoma do epitélio basal alveolar humano (A549) à nitrato de prata, induzindo apoptose de modo dosedependente que foi acompanhado de redução no potencial de membrana mitocondrial. O efeito pró-apoptótico de nanopartículas contendo prata foi demonstrado em células de câncer de mama das linhagens MCF-7, HCC1954 e HCC70, que demonstraram percentual de apoptose na população até 5 vezes maior quando tratadas por 24h com 12,5 µg/mL de AgNP (RODRÍGUEZ-RAZÓN *et al.*, 2018). YUAN *et al.* (2017) demonstrou em células tumorais de ovário (A2780), que AgNPs induzem apoptose mediada por caspase, possivelmente causado por *upregulation* na expressão de genes pró-apoptóticos (P53, P21, Bax, Bak, cyt-c, caspase-9 and caspase 3) and *downregulation* na expressão de Bcl-2, uma proteína antiapoptótica.

Nossos resultados demonstraram que os tratamentos com nanopartículas à base de prata induziram aumento no percentual de apoptose da população de células RPE-1 apenas quando essas foram expostas às concentrações mais altas de nanopartículas atingindo no máximo 5,23% de apoptose quando tratada por 24h com 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs. Na linhagem BT-474, os tratamentos com concentrações mais altas de nanopartículas induzem aumento no percentual de apoptose da população atingindo um máximo de aproximadamente 65% quando expostas por 48h a 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs. Já as linhagens MDA-MB-436 e A673 aumentam significativamente o percentual de apoptose mesmo quando expostas às menores concentrações de nanopartículas.

A produção celular de ROS pode ser induzida por tratamentos com AgNPs, como demonstrado por LEE *et al.*, (2016) em linhagens celulares de hepatoma (HepG2 e Huh7). Após serem expostas a nanopartículas de 5 nm, essas células apresentaram aumento significativo na produção de ROS, que refletiram em alterações no metabolismo glicolítico das células, como por exemplo, redução na liberação de lactase. No presente trabalho, a linhagem não tumoral RPE-1 não teve sua produção celular de ROS afetada pelos tratamentos com nanopartículas a base de prata. A linhagem BT-474 apresentou aumentos significativos somente quando exposta às concentrações mais altas de nanopartículas, enquanto as linhagens

MDA-MB-436 e A673, mais uma vez apresentaram aumentos significativos na produção de ROS quando tratadas com baixas concentrações de nanopartículas.

A presença de ROS pode causar morte celular por disfunção mitocondrial, uma vez que a mitocôndria é o principal local intracelular de geração de ROS e pode ainda causar danos ao DNA (RYTER et al., 2007; SHI et al., 2018). A disfunção mitocondrial e perda do potencial de membrana mitocondrial são alguns dos indicadores bioquímicos característicos da apoptose (RYTER et al., 2007). Mitocôndrias são organelas que possuem uma membrana externa e uma membrana interna, de modo que os espaços delimitados por cada uma dessas membranas apresentam características próprias. A matriz mitocondrial, delimitada pela membrana interna, por exemplo, apresenta um pH mais básico que o do espaço intermembranas e isto se deve às proteínas da cadeira transportadora de elétrons que bombeiam prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. Esta diferença de pH, gera um gradiente de voltagem (potencial de membrana) que torna possível a síntese de ATPs através da proteína ATP sintase (ALBERTS et al., 2017). As espécies reativas de oxigênio podem ser geradas caso elétrons escapem da cadeia transportadora de elétrons e sejam recebidos por moléculas de oxigênio, formando ânions superóxido (O2<sup>-</sup>), que podem ser convertidos a peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e reduzidos ao mais forte oxidante da natureza: o hidroxil (OH) (ASHARANI et al., 2009). AgNPs liberam íons Ag<sup>+</sup>, que afetam a função mitocondrial levando a ruptura na cadeia transportadora de elétrons, causando aumento na geração de ROS e redução na produção de ATP, como demonstrado por ASHARANI et al. (2009) em células IMR-90 (fibroblastos pulmonares) e U251 (Glioblastoma). Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que o potencial de membrana mitocondrial de células não tumorais RPE-1 permanece inalterado após os tratamentos com AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs. Células da linhagem tumoral BT-474, sofrem perda no potencial de membrana mitocondrial quando tratadas com as mais altas concentrações de nanopartículas (40 µg/mL de AgCl-NP e superiores a 10 µg/mL de Ag/AgCl-NP). Já nas linhagens MDA-MB-436 e A673 os tratamentos com nanopartículas a base de prata mesmo em concentrações baixas, induzem a perda no potencial de membrana mitocondrial das células. Uma hipótese para os efeitos mitocondriais observados nas células tumorais é que a liberação de íons Ag<sup>+</sup> pelas nanopartículas a base de prata, seja responsável pela geração de dano oxidativo nas células, o que levou à perda no potencial de membrana mitocondrial, morte por apoptose e queda na viabilidade celular.

Resultado semelhante foi obtido por DASGUPTA *et al.*, (2018), que demonstrou que células de câncer de cólon (HCT116) também sofre estresse oxidativo e apoptose mediada pela mitocôndria. Um estudo com células HeLa (câncer cervical) demonstrou que o tratamento com AgNPs reduz sua viabilidade, induz quebra de cromatina, exposição de forsfatidilserina e aumento da ativação das caspases 3 e 9, indicando que essas células estão sofrendo apoptose (BAHARARA *et al.*, 2018). O tratamento com AgNPs induziu também aumento na geração de ROS pelas células A2780, o que contribuiu para aumentar a apoptose (YUAN *et al.*, 2017). MAITY *et al.*, (2018) demonstrou que o tratamento com AgNPs induziu em células EAC perda no potencial de membrana mitocondrial, aumento na produção intracelular de ROS, com redução na expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax e caspase-3, indicando ativação da cascata apoptóticas.

A geração de ROS nas células induz a fosforilação de proteínas quinases IKappaB (IKK), que por sua vez são capazes de fosforilar e degradar proteínas I $\kappa$ B, que são proteínas que se ligam ao fator de transcrição NF $\kappa$ B e o mantém inativo, impedindo sua translocação para o núcleo. Uma vez fosforiladas, as proteínas I $\kappa$ B são degradadas liberando o NF $\kappa$ B, que ao se translocar para o núcleo das células e se ligar à região promotora, ativa a transcrição de genes responsáveis pela produção de diversas proteínas pró-inflamatórias, como por exemplo a interleucina IL1 $\alpha$ , capaz de recrutar células do sistema imune (GLEZER *et al.*, 2000; MANSHIAN *et al.*, 2017). MANSHIAN *et al.* (2017) demonstrou que células das linhagens tumorais HeLa e A549 quando tratadas com AgNPs apresentaram dano mitocondrial, aumento na geração celular de ROS e na quantidade de IKK $\alpha$ , I $\kappa$ B e NF $\kappa$ B fosforilados e IL1 $\alpha$ , indicando que através da geração de ROS as nanopartículas de prata são capazes de ativar vias pró-inflamatórias, o que pode ser benéfico para o tratamento de tumores.

Os tratamentos com nanopartículas a base de prata não induziram danos lisossomais nas células das linhagens RPE-1 e MDA-MB-436, enquanto as linhagens BT-474 e A673 apresentam dano lisossomal quando expostas por 48h à 40 µg/mL de AgCl-NPs e além disso, a linhagem BT-474 também sofreu danos nessa organela quando expostos 12,5 µg/mL de Ag/AgCl-NPs. Uma hipótese é que este dano pode ter sido causado pelo estresse oxidativo, que pode induzir a peroxidação de membranas levando a permeabilização da membrana lisossomal, que por sua vez, pode levar a liberação proteases como, por exemplo, a Catepsina D (BOYA & KROEMER, 2008). Este processo de liberação de proteases, além de induzir a necrose, pode inclusive induzir a apoptose celular através da ativação caspases ou de

fosfolipidases que aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial, liberando citocromo-c (BOYA & KROEMER, 2008). YANG *et al.*, (2012) demonstrou que AgNPs podem induzir *swelling* lisossomal em monócitos humanos, fenômeno que pode ser responsável pela redução na acidez lisossomal e MIYAYAMA *et al.*, (2018) demonstrou que AgNPs também induziram perda da acidificação lisossomal em células A549.

No presente trabalho observamos que os tratamentos com nanopartículas à base de prata não alteraram a área média de células das linhagens RPE-1, BT-474 e MDA-MB-436., já a linhagem A673 apresentou redução de aproximadamente 23% na área celular. Alterações na medida da área celular podem indicar redução na adesão celular ao substrato (YEUNG et al., 2005). Nossos resultados demonstraram que tratamentos com nanopartículas à base de prata não induzem alterações significativas na polimerização de actina das células RPE-1, MDA-MB-436 ou A673. Entretanto quanto exposta a concentrações acima de  $1\mu g/mL$  de Ag/AgCl-NPs a linhagem celular BT-474 apresentou indícios de redução na polimerização de microfilamentos de actina. O mesmo fenômeno foi observado por XU et al. (2013), que trataram neurônios corticais de rato com concentrações entre 0 e 50 µg/mL de AgNPs revelando não só redução dose-dependente da F-actina como também da β-tubulina. Doses subletais de AgNPs podem ainda induzir a formação de inclusões de F-actina em células tronco neurais (COOPER & SPITZER, 2015). Os mecanismos pelos quais as nanopartículas afetam a polimerização de proteínas do citoesqueleto ainda não são totalmente conhecidos, entretanto já se sabe que a interação de nanopartículas e íons de prata com proteínas podem alterar suas conformações tridimensionais (SAPTARSHI et al., 2013). Além disso, nossos resultados demonstraram que após os tratamentos as células tumorais apresentaram aumento na produção celular de ROS e a literatura mostra que ROS podem afetar os filamentos que compõe o citoesqueleto por meio da interação com proteínas que os regulam ou por meio da oxidação direta de seus componentes (VALDIVIA et al., 2015).

Este conjunto de dados aqui apresentados, mostra que as células não tumorais da linhagem RPE-1, foram menos afetadas pelos tratamentos com nanopartículas a base de prata de que as células tumorais. Observamos ainda que as células não tumorais HFF-1 apresentaram um  $IC_{50}$  significativamente menor que o das células tumorais MDA-MB-468, demonstrando que também são menos sensíveis às nanopartículas. A literatura mostra alguns resultados semelhantes com nanopartículas a base de prata. Células tumorais MCF-7, Jukart e EAC (carcinoma de Ehrlich), por exemplo, tiveram sua viabilidade reduzida de modo dose dependente enquanto linfócitos não tumorais humanos e de camundongos não sofrem efeitos significativos (MAITY *et al.*, 2018). JADHAV *et al.* (2018) também observou que células não tumorais (L929) não apresentam alterações significativas na viabilidade celular quando tratadas com até 78,62 µg/mL de AgNPs produzidas biologicamente utilizando extrato de *Salacia chinensis*, enquanto linhagens celulares de pulmão (L-132), fígado (Hep G2), pâncreas (MIA-Pa-Ca-2), mucosa bucal (KB cells), mama (MDA-MB-231), cervical (HeLa) e de próstata (PC-3) apresentam significativas reduções na viabilidade celular, com valores de IC<sub>50</sub> variando entre 4,002 a 14,37 µg/mL. Essas nanopartículas foram ainda submetidas ao ensaio de hemólise, e os resultados sugeriram que a concentração de AgNPs testada (78,67 µg/mL) induz menos de 3% de hemólise, enquanto o limite de segurança para biomateriais é de 5% de acordo com a ISO/TR 7406, demonstrando que essas nanopartículas podem ser seguras para eritrócitos saudáveis (JADHAV *et al.*, 2018).

SWANNER et al., (2015) encontrou resultados similares quando comparou o efeito de AgNPs em células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231, BT-549 e SUM-159), câncer de mama (MCF-7), células não tumorais de glândula mamária (MCF-10A e 184B5) e células epiteliais não tumorais (HMEC) demonstrando que células não tumorais são menos suscetíveis às nanopartículas de prata do que as células tumorais. Os resultados demonstraram ainda que dentre as linhagens tumorais de câncer de mama, as mais sensíveis são as linhagens triplo-negativas. Corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho, onde a linhagem triplo-negativa MDA-MB-436 foi mais sensível aos tratamentos com AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs do que a linhagem BT-474. SWANNER et al., (2015) atribuiu o fenômeno ao fato de células tumorais triplo-negativas apresentarem maior quantidade de proteínas oxidadas e de histonas yH2AX fosforiladas, utilizadas como indicadores de estresse oxidativo e danos ao DNA, respectivamente. LIM et al., 2017 tratou com 200 µg/mL de AgNPs fibroblastos não tumorais IMR-90 e linhagens tumorais de mama (MDA MB 231 e MCF-7) e cérebro (U251 e MO59K) e demonstrou que a linhagem não tumoral apresentava morfologia normal, bom desempenho no ensaio de scratch wound-healing, com total cobertura da área danificada e taxas de proliferação e apoptose semelhantes ao grupo controle, enquanto s células tumorais foram significativamente danificadas pelo. LIM et al. (2017) atribuiu o efeito mais pronunciado em células tumorais ao dano observado no DNA dessas células, demonstrado pelo aumento na fosforilação de histonas H2AX (γ-H2AX) e disfunções nos telômeros. Esses danos foram gerados pela inibição de DNA-PKc envolvida na proteção ao dano genotóxico e superativação da via da proteína JNK, que protege a célula de dano genotóxico, porém se ativada por tempo prolongado promove apoptose. A literatura mostra ainda que Ag/AgClNPs, produzidas por *Candida lusitaniae*, como as utilizadas no presente trabalho, induziram menor efeito antiproliferativo em astrócitos saudáveis de que em glioblastoma multiforme (GBM02), apresentando valores de IC<sub>50</sub> menores nas células tumorais (EUGENIO *et al.*, 2018).

Os efeitos mais pronunciados observados em células tumorais tratadas com nanopartículas à base de prata também podem estar relacionados ao microambiente. Já se sabe que o microambiente tumoral é mais ácido (Kato *et al.*, 2013) e que nanopartículas de prata podem liberar mais íons Ag<sup>+</sup> quando em ambiente ácido (Peretyazhko *et al.*, 2014), de modo que uma maior liberação de íons poderia levar a uma maior citotoxicidade.

Nossos resultados demonstraram também que Ag/AgCl-NPs foram mais citotóxicas que AgCl-NPs, essa diferença pode ser devido à composição ou tamanho das nanopartículas As AgCl-NPs possuem diâmetros entre 1,6 e 34,4 nm e diâmetro médio de 9,8  $\pm$  5,7 nm (FERREIRA *et al.*, 2017), enquanto Ag/AgClNPs tem diâmetros entre 2 e 22 nm com diâmetro médio de 6,9  $\pm$  4,5 nm (EUGENIO *et al.*, 2016). Alguns estudos têm demonstrado que nanopartículas menores são mais citotóxicas, LEE *et al.*, (2016) por exemplo demonstrou que nanopartículas de prata com diâmetro médio de 5 nm induzem aumento na produção celular de ROS em células HepG2 e Huh7 enquanto AgNPs com diâmetro de 100 nm não tem efeito. Em células PANC-1, AgNPs com diâmetros de 2,6 nm foram 16 vezes mais citotóxicas que nanopartículas de 18 nm (ZIELINSKA *et al.*, 2017). As nanopartículas menores apresentam maior área de superfície por volume, o que aumenta a interação entre partículas e microambiente circundante (RAI *et al.*, 2009).

No presente estudo os impactos da exposição à concentrações subletais de Ag/AgCl-NPs na superfície celular foram avaliados em células MDA-MB-468, um TNBC que não apresentou alterações significantes na morfologia celular após o tratamento, e em fibroblastos não tumorais da linhagem HFF-1, que após 48h de exposição, passaram a expor mais protusões de membrana. Essas protusões de membrana são muito semelhantes às encontradas por KOISTINEN *et al.* (2015) em células MCF-7. KOISTINEN *et al.* (2015) demonstram que essas projeções de membrana possuem características intermediárias entre microvilos e filopódios, por apresentarem localização apical e formato de microvilos, porém com proteínas características de filopódios como ezrina e fascina e ainda uma organização dos filamentos de actina tipicamente observada na formação de filopódios. A função dessas protusões ainda não foram claramente elucidadas, mas já se sabe que são regiões ligadas à síntese de ácido hialurônico com a presença de enzimas HAS (hialuronan sintase) (KOISTINEN *et al.* (2015). Sabe-se também que fibroblastos estimulados por interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) podem iniciar uma resposta pró-fibrótica, aumentando a síntese de ácido hialurônico que é uma molécula de matriz extracelular (MERAN *et al.*, 2013). Alguns trabalhos mostram que nanopartículas a base de prata induzem a liberação de IL-1 $\beta$ . Células pBMECs (células endoteliais isoladas de microvasos do cérebro suíno) por exemplo, liberam IL-1 $\beta$  em resposta a exposição à AgNPs (TRICKLER *et al.*, 2014) e CHARELLI *et al.* (2018) demonstraram que esferoides de células tronco de tecido adiposo humano também liberam IL-1 $\beta$  quando tratadas com AgCl-NPs. Portanto, a nossa hipótese é que a exposição à Ag/AgCl-NPs possa ter induzido nas células HFF-1 a secreção de citocinas inflamatórias, que por sua vez induziram o aumento na síntese de ácido hialurônico, desencadeando o aumento no número de protusões de membrana, visto que essas protusões estão ligadas à síntese dessas moléculas de matriz extracelular, entretanto estudos adicionais seriam necessários para comprovar esta hipótese.

Em resumo, nossos dados sugerem que as nanopartículas de cloreto de prata e de prata/cloreto de prata são promissores agentes antitumorais, uma vez que afetam viabilidade e proliferação de células tumorais, com mínimos efeitos em células não tumorais. Podendo futuramente ser uma opção viável de tratamento para cânceres que atualmente não possuem tratamentos eficazes, o que traria melhores prognósticos para muitos pacientes.

### 7. Conclusões

• AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs produzidas biologicamente por microrganismos interferem na proliferação e reduzem a viabilidade de células tumorais, esta redução foi majoritariamente causada por necrose e em menor proporção causada pelo aumento no percentual de células apoptóticas na população.

• Nossos dados sugerem que a apoptose induzida pelos tratamentos com nanopartículas a base de prata, pode ser disparada por danos à função mitocondrial que levam a aumento na produção intracelular de ROS, uma vez que as células tumorais tratadas com nanopartículas apresentaram perda no potencial de membrana mitocondrial e aumento na produção intracelular de espécies reativas de oxigênio.

• O estresse oxidativo gerado pela exposição de células das linhagens BT-474 e A673 às nanopartículas gera dano lisossomal, o que possivelmente contribuiu com a redução na viabilidade celular, uma vez que o dano lisossomal pode causar morte celular devido a liberação de proteases.

• Além disso, foi possível observar que a proliferação e a viabilidade celular das linhagens tumorais são muito mais afetadas pelos tratamentos com AgCl-NPs e Ag/AgCl-NPs do que a linhagem não tumoral RPE-1 e dentre estas, a linhagem BT-474 foi a menos sensível aos tratamentos com nanopartículas, apresentando efeitos deletérios somente quando tratada com as mais altas concentrações.

• Ag/AgCl-NPs foram mais citotóxicas que AgCl-NPs, provavelmente devido à sua composição ou à seu menor tamanho.

• Ag/AgCl-NPs induzem alterações na morfologia da superfície celular de fibroblastos da linhagem HFF-1, que apresentaram maior número de protusões de membrana que possivelmente devido à ativação de uma resposta pró-fibrótica, uma vez que essas protusões estão associadas à síntese de moléculas de matriz extracelular.

### 8. Referências

ABBASI A.R. e MORSALI A. Synthesis and characterization of AgCl nanoparticles under various solvents by ultrasound method. **J Inorg Organomet Polym**, v.23, p.286–292. 2013.

AHMAD F., ASHRAF N., ASHRAF T., ZHOU R., YIN D. Biological synthesis of metallic nanoparticles (MNPs) by plants and microbes: their cellular uptake, biocompatibility, and biomedical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 7, p.2913-2935. 2019.

AHSAN S.M., RAO C.M., AHMAD F. Nanoparticle-Protein Interaction: The Significance and Role of Protein Corona. **Adv Exp Med Biol**, v.1048, p.175-198. 2018.

ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., MORGAN D., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P., WILSON J., HUNT T. Biologia Molecular da Célula. **Artmed**, 6<sup>a</sup> Ed. 2017.

ALLAHVERDIYEV A.M., ABAMOR E.S., BAGIROVA M., USTUNDAG C.B., KAYA C., KAYA F., RAFAILOVICH M. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. **International Journal of Nanomedicine**, v.6, p.2705–2714. 2011.

AL-THABAITI S.A., AL-NOWAISER F.M., OBAID A.Y., AL-YOUBI A.O., KHAN Z. Formation and characterization of surfactant stabilized silver nanoparticles: A kinetic study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.67, n.2, p. 230-237. 2008.

ALVES O.L. Nanotecnologia, nanociência e nanomateriais: quando a distância entre presente e futuro não é apenas questão de tempo. **Parcerias Estratégicas**, v.18, p.23-40. 2004.

AMERASAN D., NATARAJ T., MURUGAN K., PANNEERSELVAM C., MADHIYAZHAGAN P., NICOLETTI M., BENELLI G. Myco-synthesis of silver nanoparticles using *Metarhizium anisopliae* against the rural malaria vector *Anopheles culicifacies* Giles (Diptera: Culicidae). **J Pest Sci**, v.89, p.249–256. 2016.

ARROYO-CRESPO J.J., ARMIÑÁNA., CHARBONNIER D., DELADRIERE C., PALOMINO-SCHÄTZLEIN M., LAMAS-DOMINGO R., FORTEZA J., PINEDA-LUCENA A., VICENT M.J. Characterization of triple-negative breast cancer preclinical models provides functional evidence of metastatic progression. **Int. J. Cancer**, https://doi.org/10.1002/ijc.32270. 2019.

ASHARANI P.V., MUN G.L.K., HANDE M.P., VALIYAVEETTIL S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. **ASCnano**, v.3, n.2, p.279–290. 2009.

AUSTIN L.A., AHMAD S., KANG B., ROMMEL K.R., MAHMOUD M., PEEK M.E., EL-SAYED M.A. Cytotoxic effects of cytoplasmic-targeted and nuclear-targeted gold and silver nanoparticles in HSC-3 cells – A mechanistic study. **Toxicology in Vitro**, v.29, p.694–705. 2015.

BAHARARA J., RAMEZANI T., HOSSEINI N., MOUSAVI M. Silver Nanoparticles Synthesized Coating with Zataria Multiflora Leaves Extract Induced Apoptosis in HeLa Cells Through p53 Activation. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.17, n.2, p. 627-639. 2018.

BALAMUTH N.J., WOMER R.B. Ewing's sarcoma. Lancet Oncol., v.11, p.184-92. 2010.

BARBALINARDO M., CAICCI F., CAVALLINI M., GENTILI D. Protein Corona Mediated Uptake and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles in Mouse Embryonic Fibroblast. **Small**, v.14, p.1801219-1801219. 2018.

BARUA S., BANERJEE P.P., SADHU A., SENGUPTA A., CHATTERJEE S., SARKAR S., BARMAN S., CHATTOPADHYAY A., BHATTACHARYA S., MONDAL N.C., KARAK N. Silver nanoparticles as antibacterial and anticancer materials against human breast, cervical and oral cancer cells. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.16, p.1–9. 2016. BAILEY K.M., JULIAN C.M., KLINGHOFFER A.N., BERNARD H., LUCAS P.C., MCALLISTER-LUCAS L.M. EWS-FLI1 low Ewing sarcoma cells demonstrate decreased susceptibility to T-cell-mediated tumor cell apoptosis. **Oncotarget**, v. 10, n 36, p. 3385-3399. 2019.

BHUSHAN B. Capítulo 1: Introduction to Nanotechnology: History, Status, and Importance of Nanoscience and Nanotechnology Education. Global Perspectives of Nanoscience and Engineering Education, Science Policy Reports. 1<sup>a</sup> edição. **Springer International Publishing**. 2016.

BOGLE K.A., DHOLE S.D., BHORASKAR V.N., Silver nanoparticles: synthesis and size control by electron irradiation. **Nanotechnology**, v.17, p. 3204–3208. 2006.

BOONTO Y., ANANPATTARACHAI J., KAJITVICHYANUKUL P. Antibacterial properties of Ag and Ag/AgCl nanoparticles from radish and tea extracts. **Water Science & Technology: Water Supply**, v.16, n.1. 2016.

BOYA P., KROEMER G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. **Oncogene**, v.27, p.6434–6451. 2008.

BRAY F., FERLAY J., SOERJOMATARAM I., SIEGEL R.L., TORRE L.A., JEMAL A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin**, v. 68, p. 394–424. 2018.

BRIGGER I., DUBERNET C., COUVREUR P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 64, p. 24 – 36. 2012.

BUCKLEY J.D., PENDERGRASS T.W., BUCKLEY C.M., PRITCHARD D.J., NESBIT M.E., PROVISOR A.J., ROBISON L.L. Epidemiology of Osteosarcoma and Ewing's Sarcoma in Childhood. **Cancer**, v.83, n.7, p.1440-1448. 1998.

CAMERON P., GAISER B.K., BHANDARI B., BARTLEY P.M., KATZER F., BRIDLE H. Silver Nanoparticles Decrease the Viability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts. **Applied** and Environmental Microbiology, v.82, n.2, p.431–437, 2016

CARDOSO F., COSTA A., SENKUS E., AAPRO M., ANDRÉ F., BARRIOS C.H., et al. 3rd ESO–ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 3). Annals of Oncology, v. 28, p. 16-33. 2017.

CEDOLINI C., BERTOZZI S., LONDERO A.P., BERNARDI S., SERIAU L., CONCINA S., CATTIN F., RISALITI A. Type of Breast Cancer Diagnosis, Screening and Survival. **Clinical Breast Cancer**, v.14, n.4, p. 235-240. 2014.

CHARELLI L.E., MÜLLER N., SILVA K.R., LIMA L.M.T.R., SANT'ANNA C., BAPTISTA L.S. Biologically produced silver chloride nanoparticles from *B. megaterium* modulate interleukin secretion by human adipose stem cell spheroids. **Cytotechnology**, v.70, n.6, p. 1655–1669. 2018.

CHANKAEW C., SOMSRI S., TAPALA W., MAHATHEERANONT S., SAENJUN C., RUJIWATRA A. Kaffir lime leaf extract mediated synthesis, anticancer activites and antibacterial kinetics of Ag and Ag/AgCl nanoparticles. **Particuology**, v. 40, p. 160 – 168. 2018.

CHEN Y.H., TSAI C.Y., HUANG P.Y., CHANG M.Y., CHENG P.C., CHOU C.H., CHEN D.H., WANG C.R., SHIAU A.L., WU C.L. Methotrexate Conjugated to Gold Nanoparticles Inhibits Tumor Growth in a Syngeneic Lung Tumor Model. **Molecular Pharmaceutics**, v.4, n.5, p.713–722. 2007.

CHEN D., YOO S.H., HUANG Q., ALI G., CHO S.O. Sonochemical synthesis of Ag/AgCl nanocubes and their efficient visible-light-driven photocatalytic performance. **Chem. Eur. J.**, v.18, p.5192 – 5200. 2012.

CHENG X., ZHANG W., JI Y., MENG J., GUO H., LIU J., WU X., XU H. Revealing silver cytotoxicity using Au nanorods/Ag shell nanostructures: disrupting cell membrane and causing apoptosis through oxidative damage. **RCS Advances**, v.3, p.2296–2305. 2013.

CHOI Y.H., HAN H. Nanomedicines: current status and future perspectives in aspect of drug delivery and pharmacokinetic. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v.48, p. 43–60. 2018.

COOPER R.J., SPITZER N. Silver nanoparticles at sublethal concentrations disrupt cytoskeleton and neurite dynamics in cultured adult neural stem cells. **NeuroToxicology**, v.48, p.231-238. 2015.

DAMRON T.A., WARD W.G., STEWAR A. Osteosarcoma, Chondrosarcoma, and Ewing's Sarcoma. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.459, p.40–47. 2007.

DASGUPTA N., RANJAN S., MISHRA D., RAMALINGAM C. Thermal Co-reduction engineered silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human colon cancer cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 295, p. 109-118. 2018.

DESANTIS C.E., MA J., SAUER A.G., NEWMAN L.A., JEMAL A. Breast Cancer Statistics, 2017, Racial Disparity in Mortality by State. **Ca Cancer J Clin**, v.67, p. 439–448. 2017.

DHAS T.S., KUMAR V.G., KARTHICK V., ANGEL K.J., GOVINDARAJU K. Facile synthesis of silver chloride nanoparticles using marine alga and its antibacterial efficacy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.120, p.416–420. 2014.

DURÁN N., NAKAZATO G., SEABRA A.B. Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.100, p.6555–6570. 2016.

EDMUNDSON M.C., CAPENESS M., HORSFALL L. Exploring the potential of metallic nanoparticles within synthetic biology. **New Biotechnology**, v.31, n.6, p. 572 – 578. 2014.

EDISON T.N.J.I., RAJI ATCHUDAN R., KAMAL C., LEE Y.R. *Caulerpa racemosa*: a marine green alga for eco-friendly synthesis of silver nanoparticles and its catalytic degradation of methylene blue. **Bioprocess Biosyst Eng**, v.39, p.1401–1408. 2016.

ELAHI N., KAMALI M., BAGHERSAD M.H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. **Talanta**, v. 184, p. 537-556. 2018.

EUGENIO M., MÜLLER N., FRASÉS S., ALMEIDA-PAES R., LIMA L.M.T.R., LEMGRUBER L., FARINA M., DE SOUZA W., SANT'ANNA C. Yeast-derived biosynthesis of silver/silver chloride nanoparticles and their antiproliferative activity against bacteria. **RSC Advances**, v.6, n.12, p. 9893-9904. 2016.

EUGENIO M., CAMPANATI L., MÜLLER N., ROMÃO L.F., DE SOUZA J., ALVES-LEON S., DE SOUZA W., SANT'ANNA C. Silver/silver chloride nanoparticles inhibit the proliferation of human glioblastoma cells. **Cytotechnology**, v. 70, n. 6, p. 1607-1618. 2018. EUROPEAN COMMISSION. On the definition of a nanomaterial. **Official Journal of the European Union**, v. 696. 2011.

FERREIRA H.S., RANGEL M.C. Nanotechnology: general aspects and potential applications in catalysis. **Quim Nova**, v.32, n.7, p. 1860-1870. 2009.

FERREIRA V.S., CONZ M.E.F., LIMA L.M.T.R., FRASÉS S., DE SOUZA W., SANT'ANNA C. Green production of microalgae-based silver chloride nanoparticles with antimicrobial activity against pathogenic bacteria. Enzyme and Microbial Technology, v.97, p.114-121. 2017.

FREITAS JR R.A. What is nanomedicine? Nanomedicine: Nanothecnology, Biology, and Medicine, v.1, p. 2 - 9. 2005.

GAAFAR M.R., MADY R.F., DIAB R.G, SHALABY TH.I. Chitosan and silver nanoparticles: Promising anti-toxoplasma agents. **Experimental Parasitology**, v.143, p.30–38. 2014.

GAIKWAD S., INGLE A., GADE A., RAI M., FALANGA A., INCORONATO N., RUSSO L., GALDIERO S., GALDIERO M. Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. **International Journal of Nanomedicine**, v.8, p.4303–4314. 2013.

GASPAR N., HAWKINS D.S., DIRKSEN U., LEWIS I.J., FERRARI S., DELEY M., KOVAR H., GRIMER R., WHELAN J., CLAUDE L., DELATTRE O., PAULUSSEN M., PICCI P., HALL K.S., VAN DEN BERG H., LADENSTEIN R., MICHON J., HJORTH L., JUDSON I., LUKSCH R., BERNSTEIN M.L., MAREC-BÉRARD P., BRENNAN B., CRAFT A.W., WOMER R.B., JUERGENS H., OBERLIN O. Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration. J Clin Oncol, v.33, p. 1-11. 2015.

GEETHALAKSHMI R., SARADA D.V.L. Characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles synthesized using saponin isolated from *Trianthema decandra* L. **Industrial Crops and Products**, v.51, p.107–115. 2013.

GLATZ J.F.G., LUIKEN J.J.F.P., BONEN A. Membrane Fatty Acid Transporters as Regulators of Lipid Metabolism: Implications for Metabolic Disease. **Physiol Rev**, v. 90, p. 367–417. 2010.

GLEZER I., MARCOURAKIS T., AVELLAR M.C.W., GORENSTEIN C., SCAVONE C. The role of the transcription factor NF-kB in the molecular mechanisms of action of psychoactive drugs. **Rev Bras Psiquiatr**, v.22, n.1, p.26-30. 2000.

GLIGA A.R., SKOGLUND S., WALLINDER I.O., FADEEL B., KARLSSON H.L. Sizedependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the roletah of cellular uptake, agglomeration and Ag release. **Part Fibre Toxicol**, v. 17, p. 11-11. 2014.

GLOTZER, S. Nanoscience vs Nanotechnology: Defining the Field. ACS Nano, v.9, n.3, p.2215–2217. 2015.

GOMAA E.Z. Antimicrobial, antioxidant and antitumor activities of silver nanoparticles synthesized by *Allium* cepa extract: A green approach. **Journal of genetic engineering and biotechnology**, v.15, p.49-57. 2017.

GONZÁLEZ-BALLESTEROS N., RODRÍGUEZ-ARGÜELLES M.C., PRADO-LÓPEZ S., LASTRA M., GRIMALDI M., CAVAZZA A., NASI L., SALVIATI G., BIGI F. Macroalgae to Nanoparticles: study of *Ulva lactuca* L. role in biosynthesis of gold and silver nanoparticles and of their cytotoxicity on colon cancer cell lines. **Materials Science and Engineering: C**, v. 97, p. 498-509. 2019.

GOPINATH V., PRIYADARSHINI S., PRIYADHARSSHINI N.M., PANDIAN K., VELUSAMY P. Biogenic synthesis of antibacterial silver chloride nanoparticles using leaf extracts of *Cissus quadrangularis* Linn. **Materials Letters**, v.91, p.224–227. 2013.

GOSWAMI R.C.D., KALITA M.C. *Scenedesmus dimorphus* and *Scenedesmus quadricauda*: two potent indigenous microalgae strains for biomass production and CO2 mitigation - A study on their growth behavior and lipid productivity under different concentration of urea as nitrogen source. **J. Algal Biomass Utln**, v.2, p.42–49. 2011.

GOTTESMAN M.M. Mechanisms of cancer drug resistance. **Annu. Rev. Med**. v. 53, p. 615–27. 2002.

GOVINDARAJAN M., BENELLI G. Facile biosynthesis of silver nanoparticles using *Barleria cristata*: mosquitocidal potential and biotoxicity on three non-target aquatic organisms. **Parasitol Res**, v.115, p.925–935. 2016.

GOVINDARAJU K., BASHA S.K., KUMAR V.G., SINGARAVELU G. Silver, gold and bimetallic nanoparticles production using single-cell protein (*Spirulina platensis*) Geitler. J Mater Sci, v.43, p.5115–5122. 2008.

GRAF C.M., NORDMEYER D., SENGSTOCK C., AHLBERG S., DIENDORF J., RAABE J., EPPLE M., KÖLLER M., LADEMANN J., VOGT A., RANCAN F., RUEHL E. Shape-Dependent Dissolution and Cellular Uptake of Silver Nanoparticles. **Langmuir**, v.34, n.4, p.1506-1519. 2018.

GRÜNEWALD T.G.P., CIDRE-ARANAZ F., SURDEZ D., TOMAZOU E.M., DE ÁLAVA E., KOVAR H., SORENSEN P.H., DELATTRE O., DIRKSE U. Ewing sarcoma. **Nature** reviews: Disease Primers, 4, Article number 5. (2018)

GURUNATHAN S., RAMAN J., MALEK S.N.A., JOHN P.A., VIKINESWARY S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki: a potential cytotoxic agent against breast cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, v.8, p.4399–4413. 2013.

GURUNATHAN S., HAN J.W., KWON D., KIM J. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Nanoscale Research Letters**, v.9, p.373. 2014.

GURUNATHAN S., JEONG J., HAN J.W., ZHANG X., PARK J.H., KIM J. Multidimensional effects of biologically synthesized silver nanoparticles in *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and human lung (L132) and lung carcinoma A549 cells. **Nanoscale Research Letters**, v.10, n.35, p.1-17. 2015.

HAINFELD JF, SLATKIN DN, SMILOWITZ HM. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. **Phys. Med. Biol.**, v.49, p. N309–N315. 2004.

HAMILTON J.G., WATERS E.A. How are multifactorial beliefs about the role of genetics and behavior in cancer causation associated with cancer risk cognitions and emotions in the US population? **Psycho-Oncology**, v. 27, p. 640 – 647. 2018.

HARBECK N., GNANT M. Breast cancer. Lancet, v. 389, p. 1134–50. 2017.

HEMAVARTHY V., JOSÉ J. Ewing's Sarcoma: A Review Article. Indian Journal of Applied Research, v. 8, n. 1, p. 88-89. 2018.

HOCHELLA, M.F. Nanoscience and technology: the next revolution in the Earth sciences. **Earth and Planetary Science Letters**, v.203, p.593-605. 2002.

HOLOHAN C., SCHAEYBROECK S.V., LONGLEY D.B., JOHNSTON P.G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews**, v.13, p. 714 – 726. 2013.

HORTON J.K., JAGSI R., WOODWARD W.A., HO A. Breast Cancer Biology: Clinical Implications for Breast Radiation Therapy. **Int J Radiation Oncol Biol Phys**, v. 100, n. 1, p. 23-37. 2018.

HUH WW., DAW N.C., HERZOG C.E., MUNSELL M.F., MCALEER M.F., LEWIS V.O. Ewing sarcoma family of tumors in children younger than 10 years of age. **Pediatric blood and cancer**, v. 64, n.4, p. e26275. 2017.

HUSEIN M.M., RODIL E., VERA J.H. A novel method for the preparation of silver chloride nanoparticles starting from their solid powder using microemulsions. J. Colloid Interface Sci, v. 288, p.457–467. 2005.

JACOB S.J.P., PRASAD V.L.S., SIVASANKAR S., MURALIDHARAN P. Biosynthesis of silver nanoparticles using dried fruit extract of *Ficus carica* - Screening for its anticancer activity and toxicity in animal models. **Food and Chemical Toxicology**, 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.066

JADHAV K., DEORE H.L., DHAMECHA D., RAJESHWARI HR, JAGWANI S., JALALPURE S.S., BOHARA R.A. Phytosynthesis of silver nanoparticles: characterization, biocompatibility studies and anticancer activity. **ACS Biomater. Sci. Eng**. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.7b00707. 2018.

JAYASEELAN C., RAMKUMAR R., RAHUMAN A.A., PERUMAL P. Green synthesis of gold nanoparticles using seed aqueous extract of *Abelmoschus esculentus* and its antifungal activity. **Industrial Crops and Products**, v.45, p.423–429. 2013.

JENA J., PRADHAN N., DASH B.P., PANDA P.K., MISHRA B.K. Pigment mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles using diatom *Amphora* sp. and its antimicrobial activity. Journal of Saudi Chemical Society, v.19, p.661–666. 2015.

JO Y.K., KIM B. H., JUNG G. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. **Plant Dis.** V.93, p.1037-1043. 2009.

KALIMUTHO M., PARSONS K., MITTAL D., LÓPEZ J.A., SRIHARI S., KHANNA K.K. Target therapies for triple negative breast cancer: combating a stubborn. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n, 12, p. 822-846. 2015.

KANG Y.O., LEE T.S., PARK W.H. Green synthesis and antimicrobial activity of silver chloride nanoparticles stabilized with chitosan oligomer. **J Mater Sci: Mater Med**, v.25, p.2629–2638. 2014.

KANG J.P., KIM Y.J., SINGHA P., HUO Y., SOSHNIKOVA V., MARKUS J., AHN S., CHOKKALINGAM M., LEE H.A., YANGA D.C. Biosynthesis of gold and silver chloride nanoparticles mediated by *Crataegus pinnatifida* fruit extract: in vitro study of anti-inflammatory activities. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, v.46, n. 8, p. 1530-1540. 2018.

KAPLAN A., CIFTCI G.A., KUTLU H.M. The apoptotic and genomic studies on A549 cell line induced by silver nitrate. **Tumor Biology**, v. 39, n. 4, p. 1010428317695033. DOI: 10.1177/1010428317695033. 2017.

KATO Y., OZAWA S., MIYAMOTO C., MAEHATA Y., SUZUKI A., MAEDA T., BABA Y. Acidic extracellular microenvironment and cancer. **Cancer Cell International**, v. 13, n. 89. 2013.

KHALID M., KHALID N, AHMED I., HANIF R., ISMAIL M., JANJUA H.A. Comparative studies of three novel freshwater microalgae strains for synthesis of silver nanoparticles: insights of characterization, antibacterial, cytotoxicity and antiviral activities. **J Appl Phycol**, v.29, p.1851–1863. 2017.

KIM D., JEONG S., MOON J. Synthesis of silver nanoparticles using the polyol process and the influence of precursor injection. **Nanotechnology**, v.17, p.4019–4024. 2006.

KIM S.K., PARK Y. Ewing sarcoma: a chronicle of molecular pathogenesis. **Human Pathology**, v. 55, p. 91-100. 2016.

KINDTS I., BUELENS P., LAENEN A., VAN LIMBERGEN E., JANSSEN H., WILDIERS H., WELTENS C. Omitting radiation therapy in women with triple-negative breast cancer leads to worse breast cancer-specific survival. **The breast**, v. 32, p. 18-25. 2017.

KITTLER S., GREULICH C., DIENDORF J., KÖLLER M., EPPLE M. Toxicity of Silver Nanoparticles Increases during Storage Because of Slow Dissolution under Release of Silver Ions. **Chem. Mater.,** v.22, p.4548–4554. 2010.

KOISTINEN V. KÄRNÄ R., KOISTINEN A., ARJONEN A., TAMMI M., RILLA K. Cell protrusions induced by hyaluronan synthase 3 (HAS3) resemble mesothelial microvilli and share cytoskeletal features of filopodia. **Experimental Cell Research**, v. 337, p. 179-191. 2015.

KUMAR D.A., PALANICHAMY V., ROOPAN S.M. Photocatalytic action of AgCl nanoparticles and its antibacterial activity. **J Photochem Photobiol B**, v.138, p.302–306. 2014.

KUMAR N., KUMBHAT S. Capítulo 4: Nanomaterials. Nanoscience and Nanotechnology.1<sup>a</sup> Edição. John Wiley & Sons. 2016.

KRUMOV N., PERNER-NOCHTA I., ODER S., GOTCHEVA V., ANGELOV A., POSTEN C. Production of Inorganic Nanoparticles by Microorganisms. **Chem. Eng. Technol.**, v.32, n.7, p.1026–1035. 2009.

LAI P., DAEAR W., LÖBENBERG R., E.J. Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery based on gelatine, chitosan, poly(d,l-lactide-co-glycolic acid) and polyalkylcyanoacrylate., Colloids Surf B Biointerfaces, v.1, p.154–163. 2014.

LARA H.H., ROMERO-URBINA1 D.G, PIERCE C., LOPEZ-RIBOT J.L., ARELLANO-JIMÉNEZ M.J., JOSE-YACAMAN M. Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. **Nanobiotechnol**, v.13, n.91. 2015.

LATEEF A., OJO S.A., ELEGBEDE J.A., AKINOLA P.O., AKANNI E.O. Nanomedical Applications of Nanoparticles for Blood Coagulation Disorders. In: Dasgupta N., Ranjan S., Lichtfouse E. (eds) Environmental Nanotechnology. Environmental Chemistry for a Sustainable World, **Springer**, v. 14, p. 243-277. 2018.

LEE D., FORTIN C., CAMPBELL P.G.C. Contrasting effects of chloride of silver to two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlamydomonas reinhardtii*. Aquatic toxicology, v.75, p.127-135. 2005.
LEE H.J., SONG J.Y., KIM B.S. Biological synthesis of copper nanoparticles using Magnolia kobus leaf extract and their antibacterial activity. **J Chem Technol Biotechnol**, v.88, p.1971–1977. 2013.

LEE M.J., LEE S.J., YUN S.J., JANG J., KANGO H., KIM K., CHOI I., PARK SUN. Silver nanoparticles affect glucose metabolism in hepatoma cells through production of reactive oxygen species. **International Journal of Nanomedicine**, v.11, p. 55–68. 2016.

LONGHI C., SANTOS J.P., MOREY A.T., MARCATO P.D., DURÁN N., PINGE-FILHO P., NAKAZATO G., YAMADA-OGATTA S.F., YAMAUCHI L.M. Combination of fluconazole with silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* improves antifungal effect against planktonic cells and biofilm of drug-resistant *Candida albicans*. **Med Mycol**, v. 54, p. 428–432. 2016.

LIM H.K., GURUNG R.L., HANDE M.P. DNA-dependent protein kinase modulates the anticancer properties of silver nanoparticles in human cancer cells. **Mutat Res Gen Tox En**, v. 824, p. 32-41. 2017.

LOIBL S., GIANNI L. HER2-positive breast cancer. Lancet, v. 389, p. 2415–29. 2017.

LOGESWARI P., SILAMBARASAN S., ABRAHAM J. Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.19, p.311–317. 2015.

LONGLEY D.B., JOHNSTON P.G. Molecular mechanisms of drug resistance. Journal of Pathology, v. 205, p. 275–292. 2005.

LOZA K., DIENDORF J. SENGSTOCK C., RUIZ-GONZALEZ L., GONZALEZ-CALBET L.M., VALLET-REGI M., KÖLLER M., EPPLE M. The dissolution and biological effects of silver nanoparticles in biological media. **J. Mater. Chem. B**, v.2, p.1634-1643. 2014.

MAHDAVI M., NAMVAR F., AHMAD M.B., MOHAMAD R. Green Biosynthesis and Characterization of Magnetic Iron Oxide (Fe3O4) Nanoparticles Using Seaweed (*Sargassum muticum*) Aqueous Extract. **Molecules**, v.18, p.5954-5964. 2013.

MAHMOODI A., SHOORSHINIE S.Z., DORRANIAN D. Synthesis and characterization of AgCl nanoparticles produced by laser ablation of Ag in NaCl solution. **Appl Phys A**, v.122, p.452-462. 2016.

MAITY P., BEPARI M., PRADHAN A., BARAL R., ROY S., CHOUDHURY S.M. Synthesis and characterization of biogenic metal nanoparticles and its cytotoxicity and antineoplasticity through the induction of oxidative stress, mitochondrial dysfunction and apoptosis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.161, p.111–120. 2018.

MANSHIAN B.B., JIMENEZ J., HIMMELREICH U., SOENEN S.J. Presence of an Immune System Increases Anti-Tumor Effect of Ag Nanoparticle Treated Mice. Adv. Healthcare Mater, v.6, p.1601099. 2017.

MARZÁN L.M.L., TOURIÑO I.L. Reduction and Stabilization of Silver Nanoparticles in Ethanol by Nonionic Surfactants. **Langmuir**, v.12, n.15, p.3585–3589. 1996.

MERAN S., MARTIN J., LUO D.D., STEADMAN R., PHILIPS A. Interleukin-1β induces hyaluronan and CD44-dependent cell protrusions that facilitate fibroblast-monocyte binding. **American Journal of Pathology**, v. 182, n. 6, p. 2223-2240. 2013.

MIYAYAMA T., FUJIKI K., MATSUOKA M. Silver nanoparticles induce lysosomalautophagic defects and decreased expression of transcription factor EB in A549 human lung adenocarcinoma cells. **Toxicology in Vitro**, v.46, p.148–154. 2018.

MOGHIMI S.M., HUNTER A.C., MURRAY J.C. Nanomedicine: current status and future prospects. **The FASEB Journal**, v.19, p. 311-330. 2005.

MOHSENIAZAR M., BARIN M., ZARREDAR H., ALIZADEH S., SHANEHBANDI D. Potential of Microalgae and Lactobacilli in Biosynthesis of Silver Nanoparticles. **BioImpacts**, v.1, n.3, p.149-152. 2011.

MUÑOZ R.V., BORJA M.A., LONGORIA E.C. Ultrastructural Analysis of *Candida albicans* When Exposed to Silver Nanoparticles. **Plos One**, v.9, n.10, p. e108876. 2014.

NASRETDINOVA G.R., FAZLEEVA R.R., MUKHITOVA R.K., NIZAMEEV I.R., KADIROV M.K., ZIGANSHINA A.Y., YANILKIN V.V. Electrochemical synthesis of silver nanoparticles in solution. **Electrochemistry Communications**, v.50, p.69-72. 2015.

NAZEEMA T.H., SUGANNYA P.K. Synthesis and characterisation of silver nanoparticle from two medicinal plants and its anticancer property. **International Journal of Research in Engineering & Technology**, v.2, n.1, p.49-56. 2014.

NEZAMDOOST T., BAGHERIEH-NAJJAR M.B., AGHDASI M. Biogenic synthesis of stable bioactive silver chloride nanoparticles using *Onosma dichroantha* Boiss. root extract. **Materials Letters**, v.137, p.225–228. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Cancer. Disponível em: <u>https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer</u>. Publicado em: 12 Set 2018. Acesso em: 23 Jan 2019.

PANÁCEK A., KVÍTEK L., PRUCEK R., KOLÁR M., VECEROVÁ R., PIZÚROVÁ N., SHARMA V.K., NEVECNÁ T., ZBORIL R. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. **J. Phys. Chem. B**, v.110, p.16248-16253. 2006.

PANÁCEKA A., SMÉKALOVÁ M., VECEROVÁ M., BOGDANOVÁ K., RÖDEROVÁ M., KOLÁR M., KILIANOVÁ M., HRADILOVÁ S., FRONING J.P., HAVRDOVÁ M., PRUCEK R., ZBORILA R., KVÍTEK L. Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant *Enterobacteriaceae*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v.142, p.392–399. 2016.

PATERAKIS K., BROTIS A., TASIOU A., KOTOULA V., KAPSALAKI E., VLYCHOU M. Intradural extramedullary Ewing's Sarcoma: A case report and review of literature. **Neurologia I Neurochirurgia Polska**, v. 51, p. 106-110. 2017.

PATIL M.P., PALMA J., SIMEON N.C., JIN X., LIU X., NGABIRE D., KIM N., TARTE N.H., KIM G. *Sasa borealis* leaf extract-mediated green synthesis of silver–silver chloride nanoparticles and their antibacterial and anticancer activities. **New J. Chem.**, v. 41, p. 1363-1371. 2017.

PATRA JK, BAEK K. Green synthesis of silver chloride nanoparticles using *Prunus persica* L. outer peel extract and investigation of antibacterial, anticandidal, antioxidant potential. **Green Chem Lett Rev**, v.9, n.2, p.132–142. 2016.

PAULKUMAR K., RAJESHKUMAR S., GNANAJOBITHA G., VANAJA M., MALARKODI C., ANNADURAI G. Eco-friendly Synthesis of Silver Chloride Nanoparticles using *Klebsiella planticola* (MTCC 2277). **International Journal of Green Chemistry and Bioprocess**, v. 3, n.1, p.12-16. 2013a. PAULKUMAR K., RAJESHKUMAR S., GNANAJOBITHA G., VANAJA M., MALARKODI C., ANNADURAI G. Biosynthesis of silver chloride nanoparticles using *Bacillus subtilis* MTCC 3053 and assessment of its antifungal activity. **ISRN Nanomaterials**, Doi: 10.1155/2013/317963. 2013b.

PERETYAZHKO T.S., ZHANG Q., COLVIN V.L. Size-Controlled Dissolution of Silver Nanoparticles at Neutral and Acidic pH Conditions: Kinetics and Size Changes. **Environ. Sci. Technol.** v. 48, n. 20, p. 11954-11961. 2014.

PONGRAC I.M., AHMED L.B., MLINARIĆ H., JURAŠIN D.D., PAVIČIĆ I., ČERMAK A.M., MILIĆ M., GAJOVIĆ S., VRČEK I.V. Surface coating affects uptake of silver nanoparticles in neural stem cells. **J Trace Elem Med Biol**, v.50, p. 684-692. 2018.

QUESTER K., AVALOS-BORJA M., CASTRO-LONGORIA E. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. **Micron**, v.54, p.1–27. 2013.

RAI M., YADAV A., GADE A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 76-83. 2009.

REIDY B., HAASE A., LUCH A., DAWSON K.A., LYNCH I. Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications. **Materials**, v.6, p.2295-2350. 2013

RODRÍGUEZ-RAZÓN C.M.R., YAÑEZ-SÁNCHEZ I., RAMOS-SANTILLAN V.O., VELÁSQUEZ-ORDÓÑEZ C., GUTIÉRREZ-RUBIO S.A., GARCÍA-GARCÍA M.R., LÓPEZ-ROA R.I., SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ P.E., DANERI-NAVARRO A., GARCÍA-IGLESIAS T. Adhesion, proliferation, and apoptosis in different molecular portraits of breast cancer treated with silver nanoparticles and its pathway-network analysis. International Journal of Nanomedicine, v.13, p.1081–1095. 2018.

RUPARELIA J.P., CHATTERJEE A.K., DUTTAGUPTA S.P., MUKHERJI S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Acta Biomaterialia, v.4, p.707–716. 2008.

RUTBERG F.G., DUBINA M.V., KOLIKOV V.A., MOISEENKO F.V., IGNAT'EVA EV., VOLKOV N.M., SNETOV V.N., STOGOV A.Y. Effect of Silver Oxide Nanoparticles on Tumor Growth in Vivo. **Biochemistry and Biophysics**, v.421, p.191–193. 2008.

RYTER S.W., KIM H.P., HOETZEL A., PARK J.W., NAKAHIRA K., WANG X., CHOI A.M.K. Mechanisms of Cell Death in Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.9, n.1, p. 49-89. 2007.

SAID D.E., El Samad L.M., Gohar Y.M. Validity of silver, chitosan, and curcumin nanoparticles as anti-*Giardia* agents. **Parasitol Res**, v.111, p.545–554. 2012.

SAMUEL P., PINK R.C., CALEY D.P., CURRIE J.M.S., BROOKS S.A., CARTER D.R.F. Over-expression of miR-31 or loss of KCNMA1 leads to increased cisplatin resistance in ovarian cancer cells. **Tumor Biol.**, v.37, n.2, p.2565–2573. 2016.

SAPTARSHI S.R., DUSCHL A., LOPATA A.L. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. Journal of Nanobiotechnology, v.11, n.26. 2013.

SATO M., MURATA Y., MIZUSAWA M., IWAHASHI H., OKA S. A simple and rapid dual-fluorescence viability assay for microalgae. **Microbiol. Cult. Coll.**, v. 20, n. 2, p.53-59. 2004.

SCHAMING D., REMITA H. Nanotechnology: from the ancient time to nowadays. **Foundations of chemistry**, v.17, n.3, p.187–205. 2015.

SCHMADEKA, R., HARMON, B.E., SINGH, M. Triple-Negative Breast Carcinoma. Am. J. Clin. Pathol., v.141, p.462-477. 2014.

SEGUIN L, DESGROSELLIER J.S., WEIS S.M., CHERESH D.A. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. **Trends in cell biology**, v.25, n.4, p.234-240. 2013.

SHAKIBAIE M., FOROOTANFAR F., MOLLAZADEH-MOGHADDAM K., BAGHERZADEH Z., NAFISSI-VARCHEH N., SHAHVERDI A.R., FARAMARZI M.A. Green synthesis of gold nanoparticles by the marine microalga *Tetraselmis suecica*. **Biotechnol. Appl. Biochem**. v.57, p.71–75. 2010.

SHANTHI S., JAYASEELAN B.D., VELUSAMY P., VIJAYAKUMAR S., CHIH C.T., VASEEHARAN B. Biosynthesis of silver nanoparticles using a probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 and their antibiofilm activity and toxicity effects in *Ceriodaphnia cornuta*. **Microbial Pathogenesis**, v.93, p.70-77. 2016.

SHARMA R., BISEN D.P., SHUKLA U., SHARMA B.G. X-ray diffraction: a powerful method of characterizing nanomaterials. **Recent Research in Science and Technology**, v. 4, n. 8, p. 77-79. 2012.

SHERLEY J.L., STADLER P.B., STADLER J.S. A quantitative method for the analysis of mammalian cell proliferation in culture in terms of dividing and non-dividing cells. **Cell Proliferation**, v.28, n.3, p.137-44. 1995.

SHI T., SUN X., HE Q. Cytotoxicity of Silver Nanoparticles against Bacteria and Tumor Cells. Current Protein and Peptide Science, v.19, n.6, p.525-536. 2018

SIDDIQUI M.R.H., ADIL S.F., ASSAL M.E., ALI R., AL-WARTHAN A. Synthesis and characterization of silver oxide and silver chloride nanoparticles with high thermal stability. **Asian J Chem**, v.25, n.6, p.3405-3409. 2013.

SINGH P., RAJA R.B. Biological Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using the Fungus *Trichoderma Harzianum*. **Asian J. Exp. Biol. Sci.** v.2, n.4, p.600-605. 2011.

SINGH R.P., RAMARAO P. Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. **Toxicology Letters**, v. 213, p. 249-259. 2012.

SMEKALOVA M., ARAGON V., PANACEK A., PRUCEK R., ZBORIL R., KVITEK L. Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens. **The Veterinary Journal**, v.209, p.174–179. 2016.

SONG J., ROH J., LEE I., JANG J. Low temperature aqueous phase synthesis of silver/silver chloride plasmonic nanoparticles as visible light photocatalysts. **Dalton Transactions**, v.42, n.38, p.13897-904. 2013.

SONKER A.S., RICHA J.P., RAJNEESH V.K.K., SINHA R.P. Characterization and *in vitro* antitumor, antibacterial and antifungal activities of green synthesized silver nanoparticles using cell extract of *Nostoc* sp. strain HKAR-2. **Can J Biotech**, v.1, n.1, p. 26 – 37. 2017.

STAFFORD S., GARCIA R.S., GUN'KO Y.K. Multimodal Magnetic-Plasmonic Nanoparticles for Biomedical Applications. **Appl. Sci.**, v.8, n. 97, p. 1-16. 2018.

SWANNER J., MIMS J., CARROLL D.L., AKMAN S.A., FURDUI C.M., TORTI S.V., SINGH R.N. Differential cytotoxic and radiosensitizing effects of silver nanoparticles on

triple-negative breast cancer and non-triple-negative breast cell. **International Journal of Nanomedicine**, v.10, p.3937–3953. 2015.

SYED A., AHMAD A. Extracellular biosynthesis of platinum nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v.97, p.27–31. 2012.

SUJITHA V., MURUGAN K., PAULPANDI M., PANNEERSELVAM C., SURESH U., RONI M. et al., Green-synthesized silver nanoparticles as a novel control tool against dengue virus (DEN-2) and its primary vector *Aedes aegypti*. **Parasitol Res**, v.114, p.3315–3325. 2015.

TANG Y., WANG Y., KIANI M.F., WANG B. Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 16, n. 5, p. 335-343. 2016.

THAKKAR K.N., MHATRE S.S., PARIKH R.Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, v.6, p.257–262. 2010.

THOMBRE R., MEHTA S., MOHITE J., JAISINGHAN P. Synthesis of silver nanoparticles and its cytotoxic effect against THP-1 cancer cell line. **Int J Pharm Bio Sci**, v.4, n.1, p.184 – 192. 2013.

TOMASETTI C., LI L., VOGELSTEIN B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. **Science**, n. 355, p. 1330–1334. 2017.

TRICKLER W.J., LANTZ-MCPEAK S.M., ROBINSON B.L., PAULE M.G., SLIKKER. W., BIRIS A.S., SCHLAGER J.J., HUSSAIN S.M., KANUNGO J., GONZALEZ C., ALI S.F. Porcine brain microvessel endothelial cells show pro-inflammatory response to the size and composition of metallic nanoparticles. **Drug Metab Rev**, v. 46, n. 2, p. 224–231. 2014.

VALDIVIA A., DURAN C., SAN MARTIN A. The role of Nox-mediated oxidation in the regulation of cytoskeletal dynamics. **Current Pharmaceutical Design**, v.21, n. 41, p. 6009-6022. 2015.

VALODKAR M., JADEJA R.N., THOUNAOJAM M.C., DEVKAR R.V., THAKORE S. Biocompatible synthesis of peptide capped copper nanoparticles and their biological effect on tumor cells. **Materials Chemistry and Physics**, v.128, p.83–89. 2011.

VARNER K., SANFORD J., VENKATAPATHY B.R., EL-BADAWY A., FELDHAKE D. State of the Science Literature Review: Everything Nanosilver and More. **Environmental Protection Agency**, Washington, DC, EPA/600/R-10/084. 2010.

VERMA M., MARUVADA P., SRIVASTAVA S. Epigenetics and Cancer. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, v. 41, p. 585–607. 2004.

VITHIYA K., SEN S. Biosynthesis of nanoparticles. IJPSR, v.2, n.11, p.2781-2785. 2011.

VLASHI E., PAJONK F. Cancer stem cells, cancer cell plasticity and radiation therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v.31, p.28–35. 2015.

WEI Y., CHEN S., KOWALCZYK B., HUDA S., GRAY T.P., GRZYBOWSKI B.A. Synthesis of Stable, Low-Dispersity Copper Nanoparticles and Nanorods and Their Antifungal and Catalytic Properties. **J. Phys. Chem. C**, v.114, p.15612–15616. 2010.

WEI L., LU J., XU H., PATEL A., CHEN Z., CHEN G. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 5, p. 595-601. 2015.

WHITESIDES. GM. Nanoscience, Nanotechnology, and Chemistry. Small, v.1, n.2, p.172 – 179. 2005.

XUE B., HE D., GAO S., WANG D., YOKOYAMA K., WANG L. Biosynthesis of silver nanoparticles by the fungus *Arthroderma fulvum* and its antifungal activity against genera of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium*. **International Journal of Nanomedicine**, v.11, p.1899–1906. 2016.

XU F., PIETT C., FARKAS S., QAZZAZ M., SYED N.I. Silver nanoparticles (AgNPs) cause degeneration of cytoskeleton and disrupt synaptic machinery of cultured cortical neurons. **Molecular Brain**, v.6, n.29. 2013.

YANG E., KIM S., KIM J.S., CHOI I. Inflammasome formation and IL-1 $\beta$  release by human blood monocytes in response to silver nanoparticles. **Biomaterials**, v.33, p. 6858-6867. 2012.

YEUNG T., GEORGES P.C., FLANAGAN L.A., MARG B., ORTIZ M., FUNAKI M., ZAHIR N., MING W., WEAVER V., JANMEY P.A. Effects of Substrate Stiffness on Cell Morphology, Cytoskeletal Structure, and Adhesion. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v.60, p.24–34. 2005.

YUAN Y., PENG Q., GURUNATHAN S. Silver nanoparticles enhance the apoptotic potential of gemcitabine in human ovarian cancer cells: combination therapy for effective cancer treatment. **International Journal of Nanomedicine**, v.12, p.6487–6502. 2017.

ZENG H., DU X., SINGH S.C., KULINICH S.A., YANG S., HE J., CAI W. Nanomaterials via Laser Ablation/Irradiation in Liquid: A Review. **Adv Funct Mater**, v.22, p.1333–1353. 2012.

ZIELINSKA E., ZAUSZKIEWICZ-PAWLAK A., WOJCIK M., INKIELEWICZ-STEPNIAK I. Silver nanoparticles of different sizes induce a mixed type of programmed cell death in human pancreatic ductal adenocarcinoma. **Oncotarget**, v.9, n.4, p. 4675-4697. 2018.

ZINICOVSCAIA I. Use of bacteria and microalgae in synthesis of nanoparticles. Chemistry Journal of Moldova. **General, Industrial and Ecological Chemistry**, v.7, n.2, p.32-38. 2012.

ZHANG J.Z., NOGUEZ C. Plasmonic Optical Properties and Applications of Metal Nanostructures. **Plasmonics**, v.3, p.127–150. 2008.

ZHANG T., ZHANG S., YANG F., WANG L., ZHU S., QIU B., LI S., DENG Z. Efficacy Comparison of Six Chemotherapeutic Combinations for Osteosarcoma and Ewing's Sarcoma Treatment: A Network Meta-Analysis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.119, p. 250– 259. 2018.

ZHOU L., LIU X., SUN M., ZHANG X., GERMAN P., BAI S., DING Z., TANNIR N., WOOD C.G., MATIN S.F., KARAM J.A., TAMBOLI P., SIRCAR K., RAO P., RANKIN E.B., LAIRD D.A., HOANG A.G., WALKER C.L., GIACCIA A.J., JONASCH E. Targeting MET and AXL overcomes resistance to sunitinib therapy in renal cell carcinoma. **Oncogene**, v.35, p.2687–2697. 2015.