



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



NATALI LISETTE HARO CHÁVEZ

**Efeito citotóxico de microcristais de Tungstato de prata e de
Molibdato de prata em fibroblastos gengivais humanos cultivados
em monocamada e em equivalente dermal**

Araraquara

2017



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



NATALI LISETTE HARO CHÁVEZ

**Efeito citotóxico de microcristais de Tungstato de prata e de
Molibdato de prata em fibroblastos gengivais humanos cultivados
em monocamada e em equivalente dermal**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Materiais Odontológicos e Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista - Unesp, para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani
Co-orientadora: Dra. Erica Dorigatti de Avila

Araraquara

2017

Haro Chávez, Natali Lisette

Efeito citotóxico de microcristais de Tungstato de prata e de Molibdato de prata em fibroblastos gengivais humanos cultivados em monocamada e em equivalente dermal / Natali Lisette Haro Chávez.-- Araraquara: [s.n.], 2017.
71 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Prótese) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

Co-orientadora: Profa. Dra. Erica Dorigatti De Avila

1. Nanopartículas 2. Fibroblastos. 3. Toxicidade I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

NATALI LISETTE HARO CHÁVEZ

Efeito citotóxico de microcristais de Tungstato de prata e de Molibdato de prata em fibroblastos gengivais humanos cultivados em monocamada e em equivalente dermal

Dissertação para obtenção do grau de Mestre.

Comissão julgadora

Presidente e orientador: Prof. Dr. CARLOS EDUARDO VERGANI

Pesquisador III, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.

2º Examinador: Prof. Dr. CÁSSIO DO NASCIMENTO

Pesquisador III, do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP.

3º Examinador: Profa. Dra. ANA CLAUDIA PAVARINA

Pesquisador III, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.

Araraquara, 12 de maio de 2017.

DADOS CURRICULARES

NATALI LISETTE HARO CHÁVEZ

NASCIMENTO: 27/06/1990 – Lima – Perú

FILIAÇÃO: Nilda Isabel Chávez Medina (Mãe)

Armando Rigoberto Haro Chávez (Pai)

2015/2017 Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, nível Mestrado
Universidade Estadual Paulista, Araraquara- Brasil

2007/2012 Curso de Graduação em Odontologia
Universidad de San Martín de Porres, Lima- Perú

AGRADECIMENTOS

Diante da conquista alcançada, agradeço infinitamente a Deus que esteve comigo não somente nestes anos de preparação acadêmica, mas também durante toda minha vida. Pela força e vontade que produz em mim para continuar cada dia e por me ajudar a concluir mais uma etapa importante da minha carreira. Não é por acaso que eu cheguei até aqui, mas sim por benção por parte dele.

Aos meus queridos pais, Armando e Nilda, pelo amor e confiança depositado em mim, por todos os cuidados e conselhos, pela educação, apoio e incentivo ao longo de todos esses anos na minha vida. Pelos momentos de alegria e também de tristeza, eu não senti vocês longe, pois vocês sempre estiveram me acompanhando. Dedico meus sucessos a vocês. Vocês fizeram de mim a pessoa capaz de tomar decisões e prosseguir seus sonhos no meio das circunstâncias e eu só tenho gratidão no meu coração.

Ao meu namorado Adrian R., pelo amor e compreensão, seu apoio, carinho, paciência, e preocupação que teve comigo foi sempre muito importante e gratificante.

A toda minha família Haro - Chávez, e aos que mais perto de mim estão (tios Emilio e Flor, Papá Emilio e família), por acreditar em mim, meu sucesso é de todos vocês.

Ao meu prezado orientador, Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani, por esta grande oportunidade e confiança depositada em mim, pelas orientações, sugestões e ajuda ao longo deste trabalho.

A minha co-orientadora, Dra. Erica Dorigatti de Avila, pela oportunidade de trabalhar juntas, estou muito grata por toda a paciência que teve comigo e certamente aprendi muito na sua companhia. É gratificante ter a doutora na minha vida acadêmica.

Aos meus prezados amigos no Brasil (Midian, Cristiane, Uxua, Danny, Julia L e Juventina L) vocês me brindaram sua amizade e carinho, tornando minha estadia em Araraquara muito agradável e especial. Agradeço de coração pela sua companhia e carinho.

Ao programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, FOAr-UNESP, em especial à Profa. Dra. Ana Claudia Pavarina.

À equipe do laboratório de cultura celular, FOAr-UNESP: Profa. Dra. Janaina Habib Jorge, que gentilmente abriu as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar parte deste trabalho. À Dra. Paula Barbugli pelas orientações e sugestões ao longo da minha pesquisa, assim também a Kássia, Camila, Andressa e Bruna pela gentileza e ajuda compartilhada oportunamente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro na modalidade bolsa de estudo (CNPq Processo 163196/2015-0) e ao Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais (CDMF) no auxílio à pesquisa (FAPESP CEPID Processo 13/07296-2).

Haro Chávez NL. Efeito citotóxico de microcristais de Tungstato de prata e de Molibdato de prata em fibroblastos gengivais humanos cultivados em monocamada e em equivalente dermal [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

RESUMO

A associação da prata a outros compostos vem sendo estudada em uma tentativa de acentuar as propriedades antimicrobianas e reduzir a citotoxicidade deste metal quando em altas concentrações. O presente estudo investigou o efeito dos microcristais: tungstato de prata ($\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$) e molibdato de prata ($\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$), no comportamento das células gengivais em monocamada e em modelo de matriz de colágeno, simulando a reparação tecidual. Para isto, fibroblastos gengivais (FGH) foram cultivados e utilizados somente entre as passagens 3 e 8 para formação de monocamada e para a confecção do equivalente dermal em matriz de colágeno em três dimensões (3D). Ambos microcristais foram utilizados na concentração fungicida mínima (CFM) capaz de matar o fungo *Candida albicans* (*C. albicans*) e foram definidas como C2: 7,81 $\mu\text{g/mL}$ para tungstato de prata e 15,62 $\mu\text{g/mL}$ para molibdato de prata. A partir destes valores, concentrações 10 vezes concentradas (C3) e 10 vezes diluídas (C1) foram preparadas para melhor compreender a margem de efeito dos componentes sobre as células estudadas. Células incubadas com meio de cultura na ausência de microcristais foram utilizadas como controle negativo (C-) e células incubadas com tampão de lise (TL) como controle positivo, representando 100% de morte celular. O efeito dos microcristais na morfologia, viabilidade e proliferação das células foram inicialmente avaliados e direcionaram os experimentos sequenciais. A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a análise da integridade do DNA foram experimentos mandatórios para se conhecer o real impacto dos microcristais quando em células humanas. Os resultados quantitativos e qualitativos mostraram que $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ não afetou a atividade enzimática mitocondrial das células FGH cultivadas em monocamada e em matriz de colágeno, em contraste com $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$. Embora, o $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ não tenha interferido na proliferação celular, este composto afetou diretamente a viabilidade dos fibroblastos durante a confecção do gel em 3D. Experimentos posteriores realizados com $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ provaram que estes microcristais na concentração de C2 não danificaram o DNA. O desenvolvimento de novos materiais tem sido sempre atraente para os pesquisadores, principalmente pela possibilidade de ser utilizado para tratamento de doenças, bem como evitar a prescrição indiscriminada de antibióticos. Nossos resultados fornecem informações relevantes no que diz respeito as propriedades não citotóxicas do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ para células gengivais humanas, durante um período de tempo adequado para estimar-se o potencial de perigo.

Palavras-chave: Nanopartículas. Fibroblastos. Toxicidade.

Haro Chávez NL. Cytotoxic effect of silver Tungstato and silver Molybdate microcrystals on human gingival fibroblasts in monolayer and equivalent dermal. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

ABSTRACT

Growing interest has been reported in combining silver with other metals to improve the antimicrobial properties, reduce silver concentration and consequently its toxicity. Herein, this study investigated the effect of microcrystals silver tungstate (α -Ag₂WO₄) and silver molybdate (β -Ag₂MoO₄) on the gingival cells and three-dimensional (3D) collagen matrices behavior. For all experiments, human gingival fibroblasts cells (HGF) were used between the 3rd and 8th passage. To carry out the experiments, lowest concentrations of α -Ag₂WO₄ and β -Ag₂MoO₄ that prevents visible growth of *Candida albicans* (*C. albicans*) planktonic cells were defined as our test concentration (C2): 7,81 μ g/mL for silver tungstate and 15,62 μ g/mL for silver molybdate. Solutions prepared from initial MFC concentration, ten-folds diluted (C1) and ten-folds concentrated (C3), improved the knowledge about the concentration ranging effect against human cells. Complete medium (C-) was used as a negative control and lysis buffer (LB) served as positive control (C+), equating to 100% cell death. The effect of the microcrystals concentration on cell morphology, viability and proliferation of HGF cells led following experiments. Reactive oxygen species (ROS) generation and DNA integrity analyzes were mandatories to know the real impact of the microcrystals on human cells. The quantitative and qualitative results showed that α -Ag₂WO₄ did not affect mitochondrial enzymatic activity of HGF cells cultured in monolayer and within collagen matrices, in contrast to β -Ag₂MoO₄. Although, β -Ag₂MoO₄ did not affect cells proliferation, this compound interfered directly in cell viability during 3D gel confection. Hence, subsequent analyzes performed with α -Ag₂WO₄ proved that this microcrystals in C2 concentration did not injury the genomic DNA. The new materials development has always been attractive to researchers, mainly by the possibility of treating diseases as well as avoiding the indiscriminate antibiotic prescription. Our findings afford strong information about the effect of α -Ag₂WO₄ on cells behavior, disclosing non-cytotoxic properties against human gingival cells, during a time period adequate to measure the hazard potential.

Keywords: Nanoparticles. Fibroblasts. Toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma da sequência experimental e metodológica utilizada durante a pesquisa. Sumariza de forma didática os tipos de experimentos desenvolvidos ao longo da pesquisa. Fonte: Elaboração própria.

Figura 2 - Difração de raios X dos microcristais (a) α -Ag₂WO₄ e (b) β -Ag₂MoO₄*. (*) As linhas vermelhas indicam a intensidade relativa das estruturas cristalinas inorgânicas correspondente ao ICSD de cada material. Fonte: Fabbro et al.³⁹, 2016.

Figura 3 - Morfologia obtidas por meio de imagens FE-MEV dos microcristais (a) α -Ag₂WO₄ e (b) β -Ag₂MoO₄. Fonte: Fabbro et al.³⁹, 2016.

Figura 4 - Espectros identificando as substâncias encontradas nos microcristais (a) α -Ag₂WO₄ e (b) β -Ag₂MoO₄. Fonte: Fabbro et al.³⁹, 2016.

Figura 5 - Dados de proliferação celular em monocamada para os microcristais (a) α -Ag₂WO₄ e (b) β -Ag₂MoO₄. A análise de variância (ANOVA) foi empregada com o teste post hoc Tukey utilizando Graph-Pad Prism versão 5.0 c. Os dados são apresentados como a média \pm DP (n = 15), *p <0,05 foi considerado estatisticamente significativo. DP: Desvio padrão. (*) Houve diferença significativa entre os grupos Controle negativo (DMEM), C1, C2 com os grupos C3 e controle positivo (TL) nas primeiras 24h. Fonte: Elaboração própria.

Figura 6A - Registro microscópico em campo claro de células em monocamada para α -Ag₂WO₄. Comparação da morfologia das células fibroblastos em monocamadas, após 24 h em contato com o α -Ag₂WO₄, nas concentrações C1 e C2 com os grupos controle negativo (DMEM). As imagens foram adquiridas em aumentos de 10x e 20x vezes. Fonte: Elaboração própria.

Figura 6B - Registro microscópico em campo claro de células em monocamada para α -Ag₂WO₄. Comparação da morfologia das células fibroblastos em monocamadas, após 24 h em contato com o α -Ag₂WO₄, na concentração C3 com o

grupo controle positivo (TL). As imagens foram adquiridas em aumentos de 10x e 20x. Fonte: Elaboração própria.

Figura 7A - Registro microscópico em campo claro de células em monocamada para β -Ag₂MoO₄. Comparação da morfologia das células fibroblastos em monocamadas, após 24 h em contato com o β -Ag₂MoO₄, na concentração C3 com o grupo controle positivo (TL). As imagens apresentam aumentos de 10x e 20x. Fonte: Elaboração própria.

Figura 7B - Registro microscópico em campo claro de células em monocamada para β -Ag₂MoO₄. Comparação da morfologia das células fibroblastos em monocamadas, após 24 h em contato com o β -Ag₂MoO₄, na concentração C3 com o grupo controle positivo (TL). As imagens foram adquiridas em aumentos de 10x e 20x. Fonte: Elaboração própria.

Figura 8 - Dados de diâmetro de contração do equivalente dermal (a) e viabilidade celular após 96 h mediante o ensaio MTT (b) para α -Ag₂WO₄. As análises estatísticas foram realizadas por meio do GraphPad Prism versão 5.0 c. Os dados estão apresentados como média \pm DP (n=6). **(a)** Teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos foi utilizado com teste Dunn de comparações múltiplas. (*) Nota-se uma ausência de contração nos grupos C3 e TL quando comparado com os grupos controle negativo DMEM, C1 e C2. **(b)** análise de variância (ANOVA), complementada com o teste de Tukey. *p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Fonte: Elaboração própria.

Figura 9A - Análise microscópica em equivalente dermal para α -Ag₂WO₄. As imagens em campo claro mostram não haver alterações morfológicas nas concentrações C1 e C2 em comparação com o controle negativo (DMEM). Por outro lado, a concentração C3 demonstra lise da membrana plasmática com focos de células mortas. As imagens foram adquiridas em aumento de 10x. Fonte: Elaboração própria.

Figura 9B - Análise microscópica em equivalente dermal para $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$. As imagens em campo claro mostram não haver alterações morfológicas na concentração C1 em comparação com o controle negativo (DMEM). Por outro lado, as concentrações C2 e C3 demonstram lise da membrana plasmática com focos de células mortas. As imagens foram adquiridas em aumento de 10x. Fonte: Elaboração própria.

Figura 10 - Efeito do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ nas células FGH no interior do equivalente dermal após 24 h e 96 h de incubação. Fonte: Elaboração própria.

Figura 11 - Análise morfológica das células FGH em monocamada após 24 horas de incubação com $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. (A) Imagem mostra a morfologia celular conservada para o grupo C1 em comparação com o controle negativo (DMEM). (B) Imagem mostra a morfologia celular conservada para o grupo C2 ao contrário do grupo C3, o qual apresenta restos celulares com pequenas partículas presumivelmente dos microcristais. As imagens foram adquiridas em 70x e 100x. (C) Imagens em maior aumento, 250x e 700x, foram registradas para os grupos controle e C3 a fim de destacar as alterações morfológicas encontradas. Fonte: Elaboração própria.

Figura 12 - Produção de espécies reativas do tipo inespecífico, em diferentes tempos. A diferença estatística na liberação de radicais livres pelas células expostas ao microcristal $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ na concentração C3 em relação aos demais grupos foi mensurada de acordo com a análise de variância “one way” (ANOVA), complementada pelo teste post hoc de Tukey, utilizando GraphPad Prism versão 5.0c. Os dados estão apresentados como a média \pm DP (n = 8). *p <0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Fonte: Elaboração própria.

Figura 13 - Análise microscópica de fluorescência para células em monocamada. A intensidade da fluorescência indica similaridade na produção de espécies reativas entre o grupo controle negativo, C1 e C2. As imagens foram registradas nos primeiros 10 min após contato com os microcristais. Fonte: Elaboração própria.

Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose para separação dos fragmentos do DNA. Os grupos controle negativo (C-) e os grupos concentração C2 apresentaram apenas uma banda, confirmando que o $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ na concentração C2 não comprometeu a integridade do DNA. Os grupos controle positivo que foi a concentração C3, demonstra a presença de diferentes bandas, indicando a fragmentação da molécula analisada. As imagens são representativas de experimentos realizados em duplicata e em duas ocasiões distintas. Fonte: Elaboração própria.

QUADROS

Quadro 1 Grupos experimentais e concentrações de microcristais. Foram estabelecidos seis grupos experimentais de acordo com a CFM de ambos microcristais obtida para a *C. albicans*. A concentração de interesse, referente a CFM foi denominada de C2, e a partir desta, concentrações 10 vezes diluídas (C1) e 10 vezes concentrada (C3) foram preparadas para melhor compreensão do efeito dos microcristais sobre as células estudadas. Fonte: Elaboração própria. Fabbro et al.³⁹, 2016 (CFM para *C. albicans*).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

***p** - Valor de probabilidade

µg/mL – Microgramas por Mililitro

µL – Microlitros

AgNPs – Nanopartículas de prata

C. albicans – *Candida albicans*

CFM - Concentração Fungicida Mínima

DMEM – Dulbecco´s Modified Eagle´s Médium Low

DP - Desvio padrão.

FGH – Fibroblastos gengivais humanos

h – horas

ICSD - Inorganic Crystal Structure Database

IU/mL – Unidade Internacional por Mililitro

KPO₄ – fosfato de potássio

kV – *kilovol* (Quilovolt ou Quilovóltio)

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

mg/L - Miligramas por Litro

mg/mL- Miligramas por Mililitro

mL – Mililitros

mm – Milímetros

mM - Milimolar

mmol - Milimol

MRSA - *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente à metilina)

MTT - *Methyl thiazolyl tetrazolium* (metil tiazol tetrazolio)

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

ng - Nanograma

nm – Nanômetro

PBS - *Phosphate buffered saline* (tampão fosfato salino)

ROS – *Reactive oxygen species* (Espécies reativas de oxigênio)

SFB – Soro Fetal Bovino

TL - Tampão de lise.

V - volt ou vóltio

α -Ag₂WO₄ – Tungstato de prata

β -Ag₂MoO₄ – Molibdato de prata

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Estomatite Protética e <i>Candida albicans</i>.....	20
2.2 Nanopartículas de Prata.....	21
2.3 Análise Celular e o Modelo Equivalente Dermal.....	22
3 PROPOSIÇÃO.....	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Preparo e Caracterização dos Microcristais.....	25
4.2 Células e Condições de Crescimento.....	26
4.3 Grupos Amostrais.....	27
4.4 Concentração de Prata nos Microcristais.....	27
4.5 Métodos de Análises.....	28
4.6 Análise Estatística.....	33
5 RESULTADOS.....	34
5.1 Caracterização dos Microcristais e Concentração de Prata.....	34
5.2 Efeito dos Microcristais na Proliferação e Morfologia Celular.....	36
5.3 Efeito dos Microcristais no Reparo Tecidual.....	42
5.4 Efeito do α-Ag₂WO₄ na Morfologia Celular.....	48
5.5 Efeito do α-Ag₂WO₄ na Produção de Espécies Reativas de Oxigênio.....	51
5.6 Efeito do α-Ag₂WO₄ na Integridade do DNA.....	53
6 DISCUSSÃO.....	55
7 CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é considerada um ambiente único, apresentando diferentes habitats e condições ecológicas para a colonização e crescimento de bactérias, fungos e vírus (Avila et al.⁸, 2009; Wright et al.¹³², 2013; Krom et al.⁶⁷, 2014). As infecções orais são ocasionadas por um desequilíbrio na microflora, influenciada por fatores locais (fluxo salivar, pH, temperatura e higiene oral) (Filoche et al.⁴⁰, 2010), sistêmicos e/ou ambientais como a diminuição do mecanismo de defesa no indivíduo, deficiência nutricional, hábitos nocivos e uso de medicamentos (Holmstrup et al.⁵², 2003; Muzyka, Epifanio⁸⁵, 2013). Este desequilíbrio na cavidade oral permite a formação de biofilmes, o que torna a comunidade microbiana ainda mais resistente a agentes externos (Tuson, Weibel¹²³, 2013). O biofilme é definido como uma estrutura composta por uma diversidade de micro-organismos, embebidas em matriz polimérica extracelular (Hall-Stoodley et al.⁴⁶, 2009; Kolenbrander et al.⁶⁵, 2010). A complexidade desta estrutura dificulta a penetração de agentes antimicrobianos e facilita a progressão de doenças (Hojo et al.⁵¹, 2009; Huang et al.⁵⁵, 2011). Desta forma, somente o controle dos fatores de risco para infecções não se mostra suficiente, sendo necessária a realização de procedimentos para remoção mecânica de tais estruturas associadas a terapias antimicrobianas de acordo com a patologia. Dentre as possibilidades de controle e/ou tratamento de doenças orais, a prescrição de antibióticos e antifúngicos vem sendo conduzida de forma indiscriminada, na odontologia para situações tais quais: tratamento de pacientes portadores de doença periodontal em estágio avançado, pacientes portadores de doença peri-implantar (Rams et al.⁹⁸, 2014) e para tratamento de estomatite protética (Chandra et al.²⁷, 2001). Em relação a esta última, *Candida albicans* se destaca como o agente etiológico responsável pelo início e progressão da doença.

A estomatite protética afeta principalmente pacientes portadores de próteses removíveis, mostrando uma prevalência na faixa de 15% a mais de 70%, e apresentando-se com maior incidência em pacientes idosos e mulheres (Gendreau, Loewy⁴², 2011). O tratamento de rotina para este tipo de patologia envolve a utilização de antimicrobianos associada a manutenção da higiene bucal e adaptação/desinfecção das próteses (Webb et al.¹²⁷, 1998). A interrupção da terapia

ou falha na ação dos agentes químicos utilizados podem favorecer o surgimento de resistência à antifúngicos, como o desenvolvimento de tolerância a droga (Mukherjee, Chandra⁸³, 2004). Situações as quais são consideradas de extrema gravidade tendo em vista o envolvimento do fungo do gênero *Candida* com infecções sistêmicas (Tsui et al.¹²², 2016) e a possibilidade de emergência de Cepas resistentes (Blankenship et al.¹⁷, 2006; Chandra, Mukherjee²⁸, 2015). Não obstante, o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos de amplo espectro em geral, pode levar não somente ao desenvolvimento de micro-organismos resistentes (Soares et al.¹¹³, 2012; Howard et al.⁵⁴, 2013) mas também, ao desenvolvimento de infecções difíceis de erradicar (Overbye, Barrett⁹⁰, 2005; Nathan et al.⁸⁶, 2011; Nett⁸⁷, 2014). A seriedade deste problema tem sido discutida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que, recentemente, manifestou grandes preocupações sobre o estado atual da saúde humana. Esta organização estimou que aproximadamente um bilhão de pessoas serão infectadas com o *Mycobacterium tuberculosis* entre os anos de 2000 e 2020, e cerca de 35 milhões de seres humanos morrerão como resultado do ressurgimento da tuberculose em uma forma mais virulenta e resistente aos antibióticos (Shingadia, Novelli¹⁰⁶, 2003; Rossolini et al.¹⁰⁰, 2014; Ventola¹²⁷, 2015). Tendo em vista este problema, novas abordagens têm sido investigadas e desenvolvidas em uma tentativa de combater doenças sem alterar o equilíbrio biológico, como estratégia ideal para inibir ou prevenir seu crescimento.

Nas últimas décadas, o campo emergente da nanotecnologia tem desenvolvido novos materiais em nível de nanoescala (Murray et al.⁸⁴, 2000), com inúmeras aplicações na área de saúde e tecnológicas. Dentre os materiais descritos na literatura, a prata tem se destacado devido as propriedades físico-químicas e antimicrobianas inerentes a este metal. A prata é um metal não corrosivo e muito utilizado em diversas áreas por apresentar baixa toxicidade quando comparada a outros metais, além de possuir propriedades bactericidas e bacteriostáticas de amplo espectro (Azam et al.⁹, 2012; Qin et al.⁹⁶, 2014). Interessantemente, a literatura relata que este metal foi muito utilizado como um dos principais agentes terapêuticos para queimaduras, feridas e infecções bacterianas (Mahendra et al.⁷⁴, 2009), até o descobrimento dos antibióticos. Considerando que a prata é eficaz contra as bactérias do gênero *Streptococcus* da cavidade oral e outros micro-organismos

patogênicos, da mesma forma em que impede a adesão de bactérias às superfícies e formação de biofilmes, este elemento químico pode ser utilizado como um aditivo antibacteriano para materiais dentários (Spacciapoli et al.¹¹⁴, 2001; Burgers et al.²¹, 2009; Wong et al.¹³¹, 2010; de Castro et al.³⁴⁻³⁵, 2016). Em nível de nanoescala, nanopartículas de prata (AgNPs) vêm admitindo ampla aplicabilidade na área da saúde por agir efetivamente contra um amplo espectro de bactérias e fungos (Cao et al.²², 2011; Anandhakumar, Raichur³, 2013), e não promover resistência (Hardes et al.⁴⁷, 2007; Zhao et al.¹³⁴, 2009). Embora o mecanismo de ação das AgNPs ainda não esteja totalmente estabelecido, acredita-se que os íons prata reajam com as cargas negativas da superfície dos micro-organismos, provocando desnaturação das proteínas e morte celular (Vazquez-Munoz et al.¹²⁶, 2014).

De acordo com outros pesquisadores, estas AgNPs penetrariam no interior das bactérias interrompendo a replicação do DNA (Panacek et al.⁹¹, 2006; Sintubin et al.¹¹², 2011). Em ambas as situações, para que este nanomaterial desempenhe a sua função, é necessário o rompimento da parede celular das bactérias (Liu et al.⁷³, 2014). Em relação a atividade antimicrobiana, alguns estudos reportaram que algumas espécies de bactérias Gram-positivas, tais como *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA), foram menos susceptíveis às AgNPs quando em comparação com espécies Gram-negativas, como por exemplo, a *Escherichia coli* (Kim et al.⁶¹, 2007). Além disso, o potencial de citotoxicidade destes nanomateriais às células eucarióticas ainda é uma preocupação e um desafio no meio científico (Ahamed et al.¹, 2012). A literatura tem reportado as consequências da intoxicação por AgNPs como possíveis alterações nas funções cognitivas, sensoriais, motoras, além de danos cerebrais e hepáticos (Kim et al.⁶⁴, 2009; Liu et al.⁷², 2010; Sharma et al.¹⁰⁴, 2012; Hwang et al.⁵⁶, 2012). Além destas injúrias, a exposição a estes nanomateriais também pode comprometer o processo natural de proliferação celular, induzindo o desenvolvimento de câncer, mesmo em concentrações de AgNPs menores de 0,5 mg/L (Carlson et al.²³, 2008; Choi, Hu³¹, 2008; Kawata et al.⁶⁰, 2009; Beer et al.¹³, 2012; Horie et al.⁵³, 2012).

Em uma tentativa de reduzir a citotoxicidade por meio da redução da concentração de íons disponíveis, a prata vem sendo sintetizada na presença de

outros metais com função carregadora, e a literatura tem reportado resultados promissores (Cao et al.²², 2011; Foggi et al.⁴¹, 2017). Neste contexto, nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido microcristais de tungstênio e molibdato contendo nanopartículas de prata, como proposta para futuras aplicações na área da saúde. Estes microcristais exibem uma estrutura em forma de rede complexa composta por radicais, os quais interagem entre si e formam uma nuvem de elétrons, cujos espectros de vibração interna geram atividade antimicrobiana (Cavalcante et al.²⁵, 2012; Gouveia et al.⁴⁴, 2014). No caso do tungstato de prata (Ag_2WO_4), a variedade de polimorfismo, decorrente da estrutura ortorrômbica e do método de síntese utilizado, interage formando aglomerados ($[\text{AgO}_7]$, $[\text{AgO}_6]$, $[\text{AgO}_4]$, e $[\text{AgO}_2]$) por meio de diferentes ângulos de ligação com O-Ag-O na rede cristalina (Cavalcante et al.²⁵, 2012). O mesmo ocorre com o molibdato de prata. Este último óxido é capaz de exibir estruturas tetragonal (fase α) ou cúbica (fase β), dependendo da pressão utilizada na síntese. (Arora et al.⁴, 2012).

Considerando os resultados microbiológicos satisfatórios destes microcristais (Longo et al.⁷⁴, 2014; Fabbro et al.³⁹, 2016), no que se refere à propriedade antimicrobiana, propusemos, neste estudo, a avaliar o efeito do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ e $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ em solução, sobre culturas celulares em monocamada de mucosa oral humana e em matriz de colágeno simulando a reparação tecidual.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estomatite Protética e *Candida albicans*

A estomatite protética (EP) é um processo infeccioso que afeta principalmente a mucosa palatina de indivíduos que fazem uso de próteses parciais ou totais removíveis (Shi et al.¹⁰⁵, 2016). A literatura apresenta esta patologia acometendo cerca de 30 a 75% dos usuários de próteses, e esta alta variação é decorrente dos fatores locais e sistêmicos inerentes a cada indivíduo (Pires et al.⁹⁵, 2002, Zissis et al.¹³⁵, 2006). Embora fungos do gênero *Candida* sejam os principais responsáveis pelo início da doença (Barbeau et al.¹², 2003), outros fatores também contribuem diretamente para o surgimento e progressão da mesma. Dentre eles: qualidade do fluxo salivar (Torres et al.¹²¹, 2003; Altarawneh et al.², 2013), trauma causadas por próteses mal adaptadas, má higiene bucal e resposta imune associada a condições sistêmicas (Budtz-Jorgensen²⁰, 1996; Webb et al.¹²⁹, 1998; Ramage et al.⁹⁷, 2004; Shulman et al.¹⁰⁷, 2005; Salvatori et al.¹⁰¹, 2016) merecem destaque.

Dentre as espécies de fungos do gênero *Candida*, a *C. albicans* é a mais comumente encontrada associada a EP. *C. albicans* é um organismo comensal que está presente normalmente na cavidade oral, podendo-se tornar patogênico e desenvolver doenças diante de um desequilíbrio na relação hospedeiro-micro-organismo, sobretudo em indivíduos susceptíveis (Muadcheingka, Tantivitayakul⁸², 2015). Espécies de *Candida* também são conhecidas pela capacidade de desenvolver biofilmes e desta forma dificultar a ação de agentes terapêuticos direcionados ao tratamento de tais infecções (Iñigo et al.⁵⁷, 2012). A concentração do fármaco a ser utilizado para combater a doença está diretamente relacionada com o estágio do biofilme, sendo as maiores concentrações inibitórias obtidas para biofilmes maduros (8 -256 µg/mL) em comparação as concentrações estabelecidas para biofilmes iniciais (0,5-16 µg/mL) (Chandra et al.²⁷, 2001; Mukherjee, Chandra⁸³, 2004; Tobudic et al.¹²⁰, 2012; Tsui et al.¹²², 2016). Em referência a EP, a literatura tem reportado desde a década de 90, altas taxas de recorrência pós-tratamento ainda nos primeiros 14 dias da resolução da doença (Budtz-Jorgensen, Lombardi¹⁹, 2000). A recorrência da EP compromete ainda mais a

eficiência dos agentes antimicrobianos utilizados para este fim, contribui para a resistência adquirida de determinadas espécies ao medicamento e torna o indivíduo ainda mais vulnerável a uma reinfecção (Gendreau, Loewy⁴², 2011; Vanden et al.¹²⁵, 2008).

Embora, o tratamento farmacológico consista principalmente na prescrição de medicamentos tais como a Anfotericina B, a Nistatina, o Fluconazol e a Clorexidina, a resistência a drogas antifúngicas vêm se tornando um problema cada vez mais evidente (Baillie, Douglas¹⁰⁻¹¹, 1990, 1999; Chandra et al.²⁹⁻³⁰, 2001, 2005). Devido a este fato, novas abordagens terapêuticas vem sendo requeridas e desenvolvidas com o propósito de prevenir e/ou tratar infecções e conseqüentemente, reduzir as altas taxas de mortalidade associadas aos micro-organismos em questão (Gudlaugsson et al.⁴⁵, 2003).

2.2 Nanopartículas de Prata

A prata (Ag), como agente antimicrobiano, vem sendo utilizada desde a antiguidade (Maillard, Hartemann⁷⁵, 2012), e até o presente momento vem sendo incluída no desenvolvimento de novos materiais com propriedades antimicrobianas. (Lemire et al.⁷⁰, 2013; Singh et al.¹¹¹, 2015; Kruk et al.⁶⁸, 2016). Na esfera da nanotecnologia, e considerando que a própria dimensão de uma partícula em nano escala revela ação contra micro-organismos, concentrações de prata variando entre entre 54 a 216 µg/mL vem sendo utilizadas para inibir de forma significativa biofilmes de *Candida* spp. (Monteiro et al.⁷⁹⁻⁸⁰, 2011, 2012; Silva et al.¹¹⁰, 2013).

Em relação a toxicidade destes nanomateriais, é importante enfatizar que não somente a concentração deve ser considerada, mas também as dimensões das nanopartículas utilizadas (Li et al.⁷¹, 2012; Zhang et al.¹³³, 2014; Wei et al.¹³⁰, 2015). Estudos mostram tamanhos das AgNPs na faixa entre 40 – 50 nm como capazes de interferir e alterar os processos de sinalização e funções celulares (Jiang et al.⁵⁸, 2008). Uma vez que o mecanismo de ação envolve basicamente a interação dos íons de prata com elementos químicos presente na membrana externa dos micro-organismos, a geração de espécies reativas conseqüência deste evento pode

também interagir com as células eucarióticas humanas e danificar o material genético (He et al.⁴⁸, 2013). Concentrações de AgNPs ao redor de 10 mg/mL, foram encontradas como sendo genotóxicas para as células humanas, causando degradação do DNA e morte celular por apoptose (De Lima et al.³⁶, 2012). Por conseguinte, as concentrações de AgNPs direcionadas a combater determinada doença devem ser cuidadosamente avaliadas em relação ao potencial citotóxico e genotóxico.

Em uma tentativa de controlar a toxicidade destes nanomateriais inerentes as dimensões, microcristais vem sendo confeccionados e decorados com prata para manter desta forma, o efeito antimicrobiano. Neste sentido, microcristais tungstato de prata e molibdato se destacam pelas propriedades fungistática e fungicida contra *C. albicans*, e bacteriostática e bactericida contra MRSA, mesmo em concentrações relativamente baixas de prata (Longo et al.⁷⁴, 2014; Fabbro et al.³⁹, 2016; Foggi et al.⁴¹, 2017). Apesar de o mecanismo de ação ainda não estar completamente bem compreendido, acredita-se que as espécies reativas produzidas pela camada externa das células microbianas, na presença dos compostos inorgânicos, atuem diretamente no DNA e afetem a respiração mitocondrial, acarretando desta forma, na morte celular (Liu et al.⁷², 2010; Hwang et al.⁵⁵, 2012, Liu et al.⁷², 2014; Vazquez-Munoz et al.¹²⁶, 2014).

2.3 Análise Celular e o Modelo Equivalente Dermal

Culturas de células em monocamada (2D) são comumente utilizadas para análises preliminares das respectivas funções frente a um material com propriedades ainda desconhecidas para células humanas (Boyce et al.¹⁸, 1985; Cooper et al.³², 1990). Não obstante, a resposta celular, resultante deste primeiro ensaio, pode direcionar a próxima etapa experimental, mas não concluir o real efeito do material (Mateasik et al.⁷⁷, 2017). Efeitos citotóxicos de materiais antimicrobianos podem ser negligenciados quando testados em modelos em 2-D, pelo fato de serem muitas vezes dependentes da organização das células em 3-D. Nos últimos anos, e também como consequência do desenvolvimento de novos materiais com propriedades antimicrobianas, o número e a qualidade dos testes de citotoxicidade também tem aumentado na mesma proporção (Stone et al.¹¹⁶, 2007; Nygaard et

al.⁸⁹, 2015). A necessidade de testes *in vitro* que melhor representem o organismo *in vivo*, instigam a criação de modelos capazes de simular uma situação clínica e ao mesmo tempo permitir o maior conhecimento do efeito adverso das concentrações utilizadas.

Para isto, modelos de cultura de células em 3-D tem sido introduzidos como uma ponte entre modelos em 2-D e modelos *in vivo* (Sutherland¹¹⁷, 1988). Dentre os modelos utilizados para estudos *in vitro*, gel em matriz de colágeno, confeccionado com células fibroblastos na presença de colágeno tipo I, se destaca pela reprodutibilidade e capacidade de mimetizar a condição de reparação do tecido. Este modelo permite acompanhar o comportamento dos fibroblastos frente ao material teste, por meio da dinâmica de contração, morfologia, viabilidade celular (Carlson et al.²⁴, 2004; Dallon, Ehrlich³³, 2008; Ehrlich, Moyer³⁸, 2013) e produção de citocinas inflamatórias (Helary et al.⁴⁹, 2006; Parekh et al.⁹², 2009; Carlson et al.²⁴, 2004). A própria morfologia celular pode também apresentar características distintas para ambos os modelos, em 2-D e em 3-D. Por exemplo, os fibroblastos geralmente se mostram em forma de fuso alongado e proliferam mais rápido em culturas de monocamada do que em modelos de matriz de colágeno. Em geral, os fibroblastos se mostram em forma de estrela em modelos de matriz de colágeno (Moulin et al.⁸¹, 1996), como resultado da contractilidade e a concentração de actina são encontradas em níveis superiores (Vande Berg et al.¹²⁴, 1989; Germain et al.⁴³, 1994; Schmitt-Graff et al.¹⁰², 1994).

Os modelos em 3-D podem se diferir entre eles em relação ao padrão de células utilizadas. Estudos focados em investigar o efeito de novas drogas e materiais na resposta inflamatória, por exemplo, tem se utilizado de modelos já estabelecidos, confeccionados a partir de células fibroblastos e monócitos, para simular o tecido humano (Parks et al.⁹³, 2014). Em geral, a engenharia tecidual tem contribuído diretamente para o avanço científico uma vez que possibilita uma melhor compreensão do real efeito de um novo material previamente a realização de experimentos em animais (Paul et al.⁹⁴, 2006; Artym et al.⁶, 2010; Bello et al.¹⁵, 2001; Nolte et al.⁸⁸, 2008).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi **avaliar, in vitro, o efeito citotóxico dos microcristais α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄ sobre fibroblastos gengivais humanos (FGH) cultivados em monocamada e em equivalente dermal de matriz de colágeno.**

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparo e Caracterização dos Microcristais

Microcristais de tungstato de prata α -Ag₂WO₄ e molibdato de prata β -Ag₂MoO₄ foram sintetizados pelo método de co-precipitação (pH 4, 70°C) utilizando água como solvente. A sequência de preparo e as caracterizações realizadas foram efetuadas de acordo com a metodologia já estabelecida e descrita por Fabbro et al.³⁹, 2016. Inicialmente, 1 mmol de dihidrato de tungstato de sódio (Na₂WO₂·2H₂O) (99,5% de pureza, Synth), e 2 mmol nitrato de prata (AgNO₃; 99,8% de pureza, Sigma Aldrich) foram dissolvidos separadamente em 50 mL de água deionizada e cada solução denominada de soluções 1 e 2, respectivamente. Por outro lado, 1 mmol de dihidrato de molibdato de sódio (Na₂MoO₄·2H₂O; 99,5% de pureza, Sigma-Aldrich) e 2 mmol de nitrato de prata (AgNO₃; 99,8% de pureza, Sigma-Aldrich) foram dissolvidos também separadamente em 50 mL de água deionizada e cada solução denominada de soluções 1 e 2, respectivamente. Em ambos microcristais a solução 2 foi, então, adicionada lentamente à solução 1 sob vigorosa agitação magnética, e na sequência, a nova mistura foi aquecida a 90°C por 10 min para melhor homogeneização. Neste momento, o processo de centrifugação foi realizado para promover a separação dos componentes, sendo o sobrenadante, então, descartado e o sedimento precipitado no fundo do tubo, submetido a uma sequência de lavagens com água deionizada e etanol, com o objetivo de neutralizar o pH das partículas. Finalmente as partículas foram mantidas em estufa de secagem a 60°C por 12 h e a concentração final, de ambos os compostos (α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄), ajustada para 2 mg/mL. A partir deste valor, os microcristais foram diluídos para obter a mínima concentração fungicida (CFM) para *C. albicans* (Fabbro et al.³⁹, 2016).

Análises qualitativas para caracterizar os microcristais confeccionados foram realizadas por meio da difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura (MEV), e espectroscopia Raman. Em relação ao primeiro, um difratômetro D/Max-2500PC (Rigaku) conformando uma radiação Cu K α (λ = 1,5406 Å) no intervalo de 2 θ entre 70° e 10°, determinou as propriedades fundamentais dos materiais no estado cristalino. A morfologia e tamanho das partículas foram registradas utilizando-

se o FE-MEV (Inspect F50, FEI Company Hillsboro), operando a 5 kV. A espectroscopia Raman (Horiba, Jobin Yvon), modelo RMS-550, com comprimento de onda de excitação de 514 nm, proporcionou informações químicas e estruturais dos compostos e confirmou a formação de ambos os microcristais. O preparo e a caracterização dos microcristais foram feitos conforme o descrito no artigo recentemente publicado por nosso grupo de pesquisa: “Fabbro MT, Foggi CC, Santos LP, Gracia L, Perrin A, Perrin, et al. Cordoncillo E, Longo E. Synthesis, antifungal evaluation and optical properties of silver molybdate microcrystals in different solvents: a combined experimental and theoretical study. Dalton Trans. 2016; 45(26): 10736-43.

4.2 Células e Condições de Crescimento

Fibroblastos gengivais humanos (linhagem FGH de células imortalizadas) foram obtidos do banco de células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro Cell Bank; Cod. 0089). As células foram mantidas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium Low Glucose* (DMEM, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, Grand Island, NY, USA), 100 IU/mL e 100 mg/mL de penicilina e estreptomicina (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), respectivamente, e 2 mM de L-glutamina (Gibco, Grand Island, NY, USA) em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ à temperatura de 37°C. Células entre as passagens 3 e 8 foram utilizadas para todos os experimentos. Após atingir a confluência de 90%, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) 1X (NaCl 140 mols.L⁻¹, KCL 3,0 mmol.L⁻¹, Na₂HPO₄ 4,30 mmol.L⁻¹, KH₂PO₄ 1,40 mmol.L⁻¹), desprendidas com solução de tripsina (0.05% trypsin-EDTA; Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) por 5 min a 37°C e então submetidas a centrifugação a 400 xg por 5 min. As células foram, então, re-suspendidas em meio de cultura DMEM de baixa glicose e na sequência, a contagem do número de células individualizadas foi realizada pelo método direto, com a utilização da câmara de Neubauer.

4.3 Grupos Amostrais

Grupos experimentais foram estabelecidos de acordo com a CFM obtida para a *C. albicans* para ambos microcristais (Quadro 1). Para todos os experimentos, trabalhamos com o CFM como a concentração desejável, definida como C2, e com concentrações 10 vezes diluída (C1) e 10 vezes concentrada (C3), como referências.

Quadro 1 – Grupos experimentais e concentrações de microcristais.

Ag₂WO₄ CFM <i>C.albicans</i> = 7.81 µg/mL	Ag₂MoO₄ CFM <i>C.albicans</i> = 15.62 µg/mL
Concentração 1 (C1) 0.781 µg/mL	Concentração 1 (C1) 1.562 µg/mL
Concentração 2 (C2) 7.81 µg/mL	Concentração 2 (C2) 15.62 µg/mL
Concentração 3 (C3) 78.1 µg/mL	Concentração 3 (C3) 156.2 µg/mL

Fonte: Elaboração própria.

Fabbro et al.³⁹, 2016 (CFM para *C. albicans*).

Células cultivadas na ausência dos microcristais representaram o controle negativo (C-) e células em contato com tampão de lise (0,2% Triton X-100), que equivale 100% de morte celular, definiram o controle positivo (C+).

4.4 Concentração de prata nos microcristais

A quantidade de prata oxidada encontrada em ambos os microcristais na concentração de interesse (C2) foram calculadas de acordo com a equação abaixo e o produto multiplicado pelo número referente a cada elemento químico. No caso dos microcristais em questão, o valor final foi multiplicado por 2.

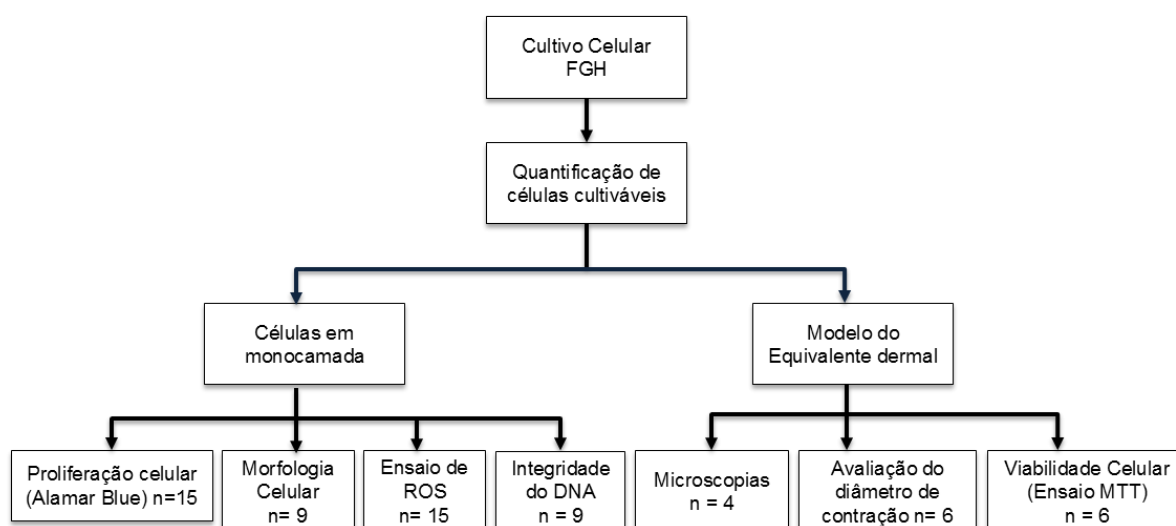
$$[] \text{ Ag} = \frac{\text{Concentração de interesse (C2) do microcristal } (\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4 \text{ e } \beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4) \times 10^{-6}}{\text{Peso molecular do microcristal } (\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4 \text{ e } \beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4)}$$

Peso molecular do microcristal (α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄)

4.5 Métodos de Análises

Os métodos de análises utilizados nesta pesquisa foram feitos em culturas de células em monocamadas e no modelo de equivalente dermal (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma da sequência experimental e metodológica utilizada durante a pesquisa.



Fonte: Elaboração própria

4.5.1 Proliferação e morfologia das Células em Monocamada

Para avaliar o efeito dos microcristais sobre a proliferação celular, foi realizado o ensaio de Alamar Blue (Sephra¹⁰³, 2012). Este método é constituído por resazurina, um corante não fluorescente, solúvel em água, estável em meio de cultura, não tóxico e capaz de atravessar a membrana celular. Contudo, as enzimas presentes nas mitocôndrias de células viáveis reduzem a resazurina em resorufina, substância de cor rosa e altamente fluorescente (Larson et al.⁶⁹, 1997). Para isto, fibroblastos FGH foram cultivados em placa preta de 96 poços (TPP[®] tissue culture plates, USA) tratada para cultura de células na concentração de 8.000 células por poço. As placas foram mantidas dentro da câmara de CO₂ por 24 h, para a formação de monocamada e, então, o meio foi removido e 200 µL da solução contendo os microcristais adicionados nas três diferentes concentrações. Em adição, o alamar blue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) foi acrescentado na concentração de 10% do volume da amostra e as alterações celulares mensuradas após 24 h de incubação,

por meio da fluorescência (Fluoroskan Ascent FL; ThermoScientific; Waltham, MA USA), com o comprimento de onda de excitação de 544 nm e emissão de 590 nm. Poços na ausência de células foram utilizados para corrigir qualquer interferência do fundo da placa de cultura. O experimento foi realizado em quintuplicata e em três diferentes ocasiões. Para cada ocasião, células da mesma cultura utilizadas para avaliação da proliferação celular foram cultivadas em placas brancas com os respectivos grupos controles, para análise no microscópio de campo claro (Leica DMI3000B). Imagens em aumentos de 10x e 20x vezes foram registradas.

A morfologia das células em monocamadas também foi avaliada após 24 h de incubação com os microcristais. Para isto, fibroblastos FGH foram cultivados sobre discos de lamínulas de vidro de 13 mm em placa de 24 poços, na concentração de 5×10^4 células por poço. As placas foram mantidas dentro da câmara de CO₂ por 24 h, para a formação de monocamada e, então, o meio foi removido e 500 µL da solução contendo os microcristais foram acrescentados nas três diferentes concentrações. As placas foram novamente mantidas sobre as mesmas condições descritas acima e após 24 h iniciou-se o processo de preparação para análise de microscopia eletrônica. As amostras foram fixadas com glutaraldeído 2,5% e na sequência, submetidas a desidratação com álcool em diferentes concentrações. Como última etapa e por se tratar de material biológico, torna-se necessário o revestimento das mesmas com material condutor. Neste caso, as amostras foram recobertas com ouro, para melhorar o nível de emissão de elétrons secundários e posicionadas sobre o dispositivo do equipamento JEOL (Modelo JSM-6610LV) operado a 10kV, para posterior análise. As imagens foram registradas em 3 diferentes aumentos 70x, 100x e 250x vezes.

4.5.2 Confeção do Equivalente Dermal, Viabilidade e Morfologia Celular, e Contração Tecidual

Fibroblastos gengivais foram mantidos como descrito anteriormente até se obter o número de células adequado para a realização desta etapa de estudo. Para a confeção do equivalente dermal em matriz de colágeno foi utilizado: 2,3 mL de DMEM, 0,45mL de SFB, 1,5mL de colágeno tipo I extraído da cauda de rato

(concentração final de 3 mg/mL), 0,25 mL de hidróxido de sódio (NaOH) e 0,5 mL de solução contendo fibroblastos a concentração de 3×10^5 células/mL foram, inicialmente, adicionadas em um tubo falcon de 50 mL, respeitando esta ordem. Este modelo de equivalente dermal foi utilizado seguindo os parâmetros descritos previamente na literatura (Bell et al.¹⁴, 1979). Em seguida, as soluções de microcristais de α -Ag₂WO₄ e de β -Ag₂MoO₄ foram acrescentadas delicadamente as demais substâncias. Os volumes utilizados na concentração C2 para Tungstato de prata foi de 19,5 μ L e para Molibdato de prata foi de 39 μ L. Após a completa homogeneização das soluções, 5 mL foram transferidos a um poço de uma placa de cultura de 6 poços, com o auxílio de uma pipeta. As placas foram mantidas por 20 min em uma incubadora de CO₂ (5%), a 37 °C, para a polimerização do gel de colágeno e, em seguida, removida para o desprendimento do gel, por meio de movimentos circulares. Posteriormente, a placa retornou a incubadora de CO₂, tendo sido mantida nas condições já mencionadas, por até 96 h. Equivalentes dermais sem a presença dos microcristais foram utilizados como controle negativo do experimento e equivalentes dermais confeccionados na presença de tampão de lise, representou o controle positivo.

O acompanhamento da contração da matriz de colágeno foi realizado após as 24 primeiras horas da confecção do equivalente dermal e após 96 h de incubação, sendo o meio de cultura trocado cada 48 h. O valor numérico da contração de cada equivalente dermal para cada tempo definido foi determinado por meio de um paquímetro universal analógico. Na sequência, a morfologia das células integradas ao equivalente dermal foi registrada com o auxílio de um microscópio de campo claro (Leica DMI3000B). A integridade dos fibroblastos expostos aos microcristais foi comparada aos controles positivos e negativos.

Para avaliar o efeito dos microcristais sobre a viabilidade celular, utilizamos o ensaio de Metil tiazol tetrazolio (MTT) [3- (4,5-dimetiltiazol-2-yl) 2,5-difeniltetrazolio brometo]. O sal de MTT é um composto hidrossolúvel que, em solução, apresenta coloração amarelo-pálido, sendo facilmente incorporado pelas células viáveis. Ao ser reduzido pelas enzimas mitocondriais, o MTT é convertido em cristais de formazan, um composto de coloração azul-escuro, não solúvel em água e que fica armazenado

no citoplasma celular. Após 96 h, o meio de cultura foi removido e o equivalente dermal lavado 3 vezes com PBS, mantendo a solução salina em contato com o gel por 5 min dentro da incubadora. Em seguida, 4 mL de MTT na concentração de 1 mg/mL, foram adicionados a cada equivalente dermal e a placa incubada por 4 h a 37 °C, dentro da incubadora a 5% CO₂. Após este período, o MTT foi removido e o equivalente dermal transferido com uma pinça estéril para um tubo falcon de 15 mL, contendo 2 mL de isopropanol. A solução foi, então, homogeneizada em vórtex por 2 min, e 250 µL foram transferidos para uma placa de cultura de 96 poços, em triplicata. O metabolismo celular foi mensurado utilizando o espectrofotômetro (EZ-Read- 400E, nova analítica Imp. Exp. LTDA, SP, Brasil) com comprimento de onda de 562 nm. O experimento MTT foi realizado em duplicata, e repetido em três diferentes ocasiões.

4.5.3 Estudo da Proliferação Celular no Equivalente Dermal.

A proliferação das células fibroblastos no interior da matriz de colágeno também foi observado após 24 h e 96 h de incubação com os microcristais nas diferentes concentrações. Para isto, FGH foram cultivados seguindo os parâmetros descritos anteriormente e células na concentração de 3×10^5 células/mL foram utilizadas para a confecção do equivalente dermal. Antes da confecção dos equivalentes dermais, as células foram colocadas em contato e incubadas com 5 mM do marcador fluorescente de divisão celular Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE), durante 20 minutos. Após este período, as células foram lavadas duas vezes com PBS contendo 1% de SFB e submetidas a centrifugação por 5 minutos. Na sequência, as células foram ressuspensas em DMEM na concentração de 3×10^5 células/mL e utilizadas para a confecção da matriz de colágeno.

Após os períodos de incubação com os microcristais previamente estabelecidos, 24 e 96 h, o meio de cultura foi removido e os géis foram mantidos incubados com 0.06 mM de iodeto de propídeo (PI) diluído em PBS. Após 15 minutos, os géis foram lavados duas vezes com PBS e a viabilidade celular avaliada por meio da microscopia de fluorescência confocal Zeiss LSM 800 (Zeiss, Jena, Germany). A fluorescência verde de CFSE e a cor vermelha de PI foram registradas

a 488 nm e 561 nm, respectivamente, para revelar a distribuição de células vivas e mortas. As imagens adquiridas em aumento de 10X (Plano NeoFluar NA 0,3 ar) são representativas da reconstrução em 3D. A confiabilidade dos dados foi confirmada por meio de replicações biológica em duas ocasiões independentes.

4.5.4 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

Para avaliar o efeito dos microcristais na produção de espécies reativas de oxigênio de tipo inespecífico, as células foram cultivadas e plaqueadas na concentração de 8.000 células por poço em uma placa preta de 96 poços para formação da monocamada. Células da mesma cultura também foram plaqueadas em placas claras para as análises da intensidade de fluorescência. Após 24 h de incubação a 37°C em câmara contendo 5% de CO₂, o meio foi removido e 200 µL de solução tampão de Krebs-Henseleit [pH 7,35 (NaCl 140 mmol.L⁻¹, KCL 3,0⁻¹)] foram acrescentados com os microcristais nas respectivas concentrações. Na sequência, 2 µL da sonda [2,7-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH), Thermo Scientific, USA) foram adicionados a cada poço para detecção inespecífica de espécies reativas de oxigênio (ROS). Para a avaliação da fluorescência produzida após diferentes tempos (1', 10', 20', 30', 90', 150' e 240'), utilizamos o fluorímetro ((Fluoroskan Ascent FL; ThermoScientific; Waltham, MA USA) com o comprimento de onda de excitação de 538 nm e de emissão 485 nm. Concomitantemente à obtenção dos dados quantitativos, células FGH foram plaqueadas em placas brancas de 96 poços, para obtenção das imagens em microscopia de fluorescência.

O experimento foi realizado em duplicata, com cada grupo experimental com controle de microcristais sem células em contato com o reagente, e em três diferentes ocasiões.

4.5.5 Estudo da Degradação do DNA Genômico.

Com o objetivo de investigar o efeito do α -Ag₂WO₄ na integridade do DNA, células FGH foram cultivadas em placas de 12 poços na concentração de 5x10⁵ células/mL por poço, e mantidas dentro da câmara de CO₂ por 24 h, para a formação de monocamada. Após este período, o meio de cultura DMEM de todos os

grupos foi trocado e o microcristal na concentração de interesse (C2) acrescentado. A placa foi incubada por 24 h para uma avaliação do efeito em longo prazo do material quando em contato com as células humanas. As células foram, então, desprendidas do fundo de placa, utilizando uma ponteira de 100 μL , e 1,5 mL do meio contendo as células foi transferido para um tubo de 1,5 mL para a posterior extração do DNA, de acordo com o protocolo do Kit MasterPure™ DNA Purification (EPICENTRE). Para isto, as amostras foram coladas em contato com o reagente de precipitação de proteínas (MPC) do kit para a obtenção do DNA. A concentração do DNA obtido foi determinada com o espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, USA). Para cada alíquota, a concentração do DNA foi normalizada para 100 ng/ μL e as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% (0,5 gramas de pó agarose) por 1 hora, com uma voltagem de 60 V. Imagens das bandas foram registradas por meio do Imager Gel Molecular sistema de documentação (Bio-Rad Laboratories). Para este estudo foi utilizado como controle positivo a concentração C3 do microcristal $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. O experimento foi realizado em duplicata e em duas ocasiões para confirmar a reprodutibilidade biológica.

4.6 Análise Estatística

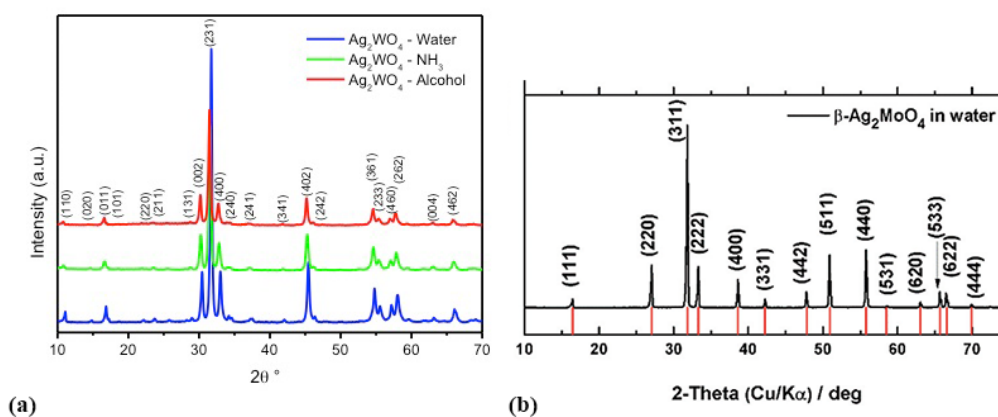
O conjunto de dados de cada variável resposta foi avaliado quanto à distribuição (aderência à curva normal) e homocedasticidade. Uma vez que todas as variáveis mencionadas acima são quantitativas contínuas, para o conjunto de dados com distribuição normal e homocedasticidade, foi aplicado o teste de análise de variância (ANOVA), complementado pelo teste de Tukey para comparações múltiplas entre grupos experimentais. Para os ensaios sem distribuição normal e/ou homocedasticidade, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn. Todas as inferências estatísticas foram baseadas no nível de 5% de significância. A análise da morfologia celular foi somente descritiva.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos Microcristais e Concentração de Prata

A técnica de difração de raios X foi empregada para registrar a evolução das fases cristalinas, determinar a estrutura e avaliar a organização estrutural dos cristais. O mecanismo de identificação ocorre pela difração dos raios após a interação com os elétrons da rede cristalina dos materiais. Neste contexto, os raios difratados das amostras de α - Ag_2WO_4 combinaram exatamente com o padrão definido pelo ICSD card no. 34-61, indicando a perfeita estrutura monofásica e ortorrômbica do composto em questão. O mesmo foi observado em relação ao β - Ag_2MoO_4 , que apresentou picos de difração nítidos e bem definidos, indicando uma estrutura cúbica sem fases deletérias ou prejudiciais, em concordância com a estrutura cristalina inorgânica registrada no banco de dados do cartão (ICSD) no. 28891.13 (traçados em cor vermelha) (Figura 2).

Figura 2 - Difração de raios X dos microcristais (a) α - Ag_2WO_4 e (b) β - Ag_2MoO_4 *. (*) As linhas vermelhas indicam a intensidade relativa das estruturas cristalinas inorgânicas correspondente ao ICSD de cada material.

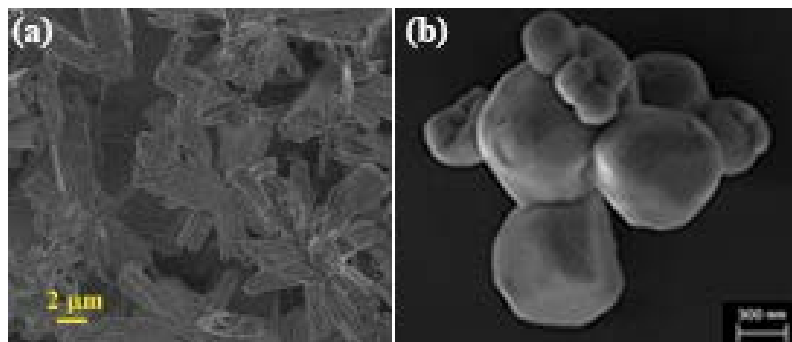


Fonte: Fabbro et al.³⁹, 2016.

As análises por meio de FE-MEV foram fundamentais para compreender as diferenças morfológicas obtidas para ambos os compostos inorgânicos. O α - Ag_2WO_4 apresentou forma hexagonal de nano “rods” (bastonetes) com 100 nm de

comprimentos. Por outro lado, microcristais de β - Ag_2MoO_4 apresentaram forma irregular e com diferentes tamanhos (Figura 3).

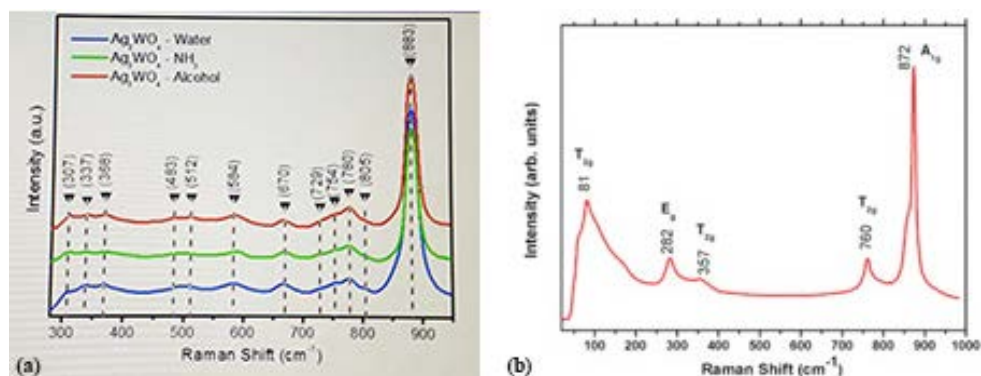
Figura 3 - Morfologia obtidas por meio de imagens FE-MEV dos microcristais (a) α - Ag_2WO_4 e (b) β - Ag_2MoO_4 *



Fonte: Fabbro et al.³⁹, 2016.

A espectroscopia Raman identificou o grau de ordem/desordem da estrutura cristalina dos microcristais. Cada composto químico admite uma frequência de vibração que atua como uma impressão digital. Desta forma, quando um material é submetido a esta análise, o programa fornece uma imagem contendo diferentes espectros (Figura 4) que permitem a identificação do material ou a presença de contaminantes e/ou alterações químicas decorrentes das interações com outras substâncias. A correlação entre a intensidade das vibrações e o comprimento de onda confirmaram a confecção dos microcristais desejados.

Figura 4 - Espectros identificando as substâncias encontradas nos microcristais (a) α - Ag_2WO_4 e (b) β - Ag_2MoO_4 *.



Fonte: Fabbro et al.³⁹, 2016.

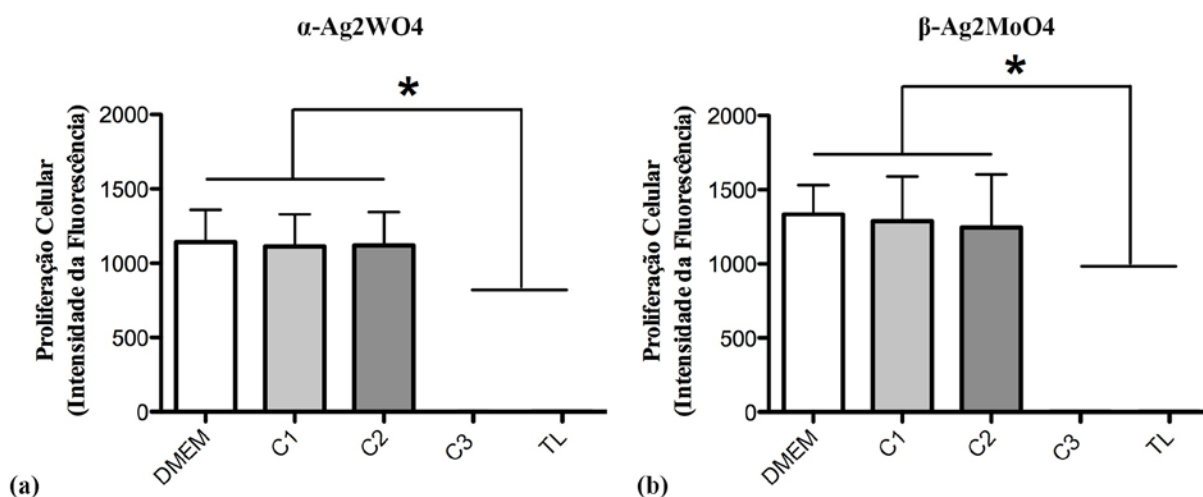
(*) Todas as imagens referentes a caracterização do β - Ag_2MoO_4 foram removidas do artigo recentemente publicado por nosso grupo de pesquisa: “Fabbro MT, Foggi CC, Santos LP, Gracia L, Perrin A, Perrin C, Vergani CE, Machado AL, Andrés J, Cordoncillo E, Longo E. Synthesis, antifungal evaluation and optical properties of silver molybdate microcrystals in different solvents: a combined experimental and theoretical study. Dalton Trans. 2016; 45(26): 10736-43.

A concentração de prata oxidada obtida na concentração de interesse (C2) foi 0,033 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para α - Ag_2WO_4 e 0,083 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para β - Ag_2MoO_4 .

5.2 Efeito dos Microcristais na Proliferação e Morfologia Celular

O efeito dos microcristais na proliferação e morfologia de fibroblastos gengivais foi analisado após 24 h de incubação. Os dados mostraram que, neste período, ambos, α - Ag_2WO_4 e β - Ag_2MoO_4 , não interferiram na proliferação das células na concentração de interesse (C2), quando em comparação com o grupo controle e com a concentração mais diluída (C1). Porém, dados contrastantes foram observados a utilizar uma concentração dos microcristais 10 vezes mais concentrados (C3), que demonstraram toxicidade semelhante ao controle de morte celular com tampão de lise (TL) (Figura 5 a, b).

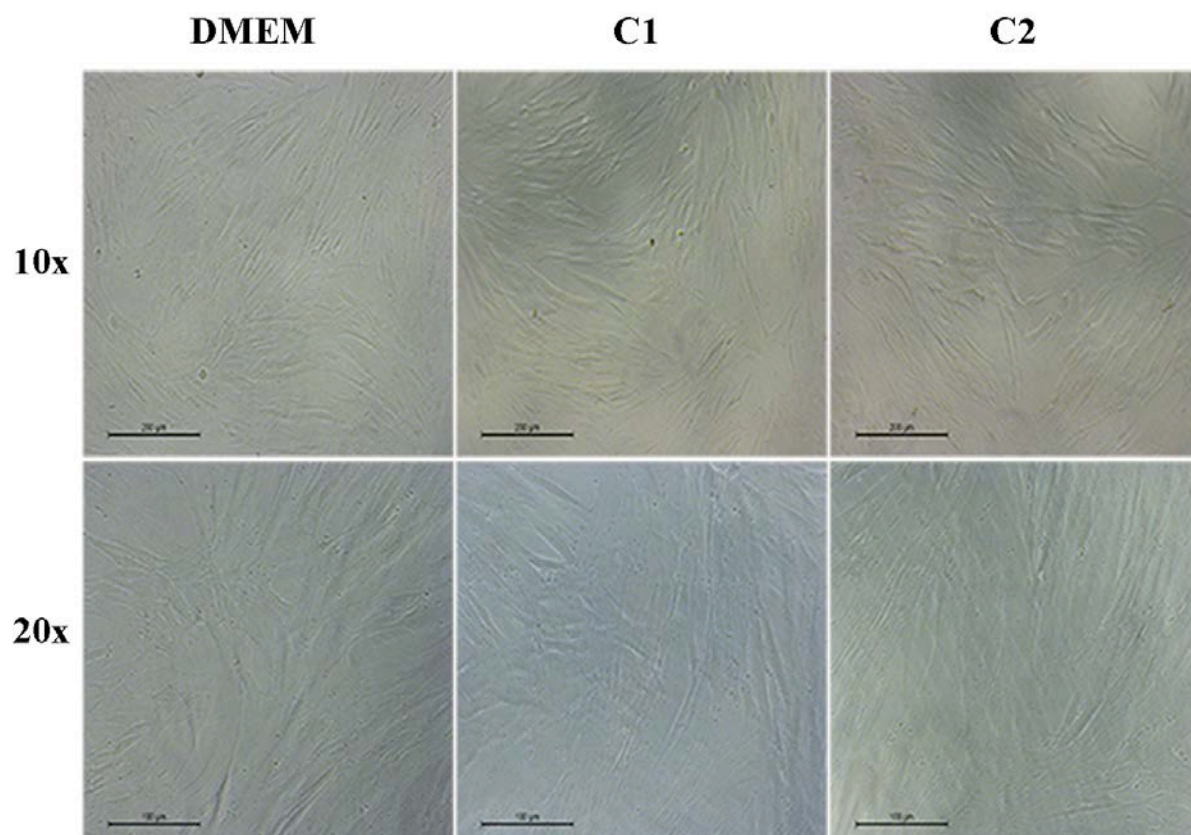
Figura 5 - Dados de proliferação celular em monocamada para os microcristais (a) α -Ag₂WO₄ e (b) β -Ag₂MoO₄. A análise de variância (ANOVA) foi empregada com o teste post hoc Tukey utilizando Graph-Pad Prism versão 5.0 c. Os dados são apresentados como a média \pm DP (n = 15), *p <0,05 foi considerado estatisticamente significativo. DP: Desvio padrão. (*) Houve diferença significativa entre os grupos Controle negativo (DMEM), C1, C2 com os grupos C3 e controle positivo (TL) nas primeiras 24h.



Fonte: Elaboração própria

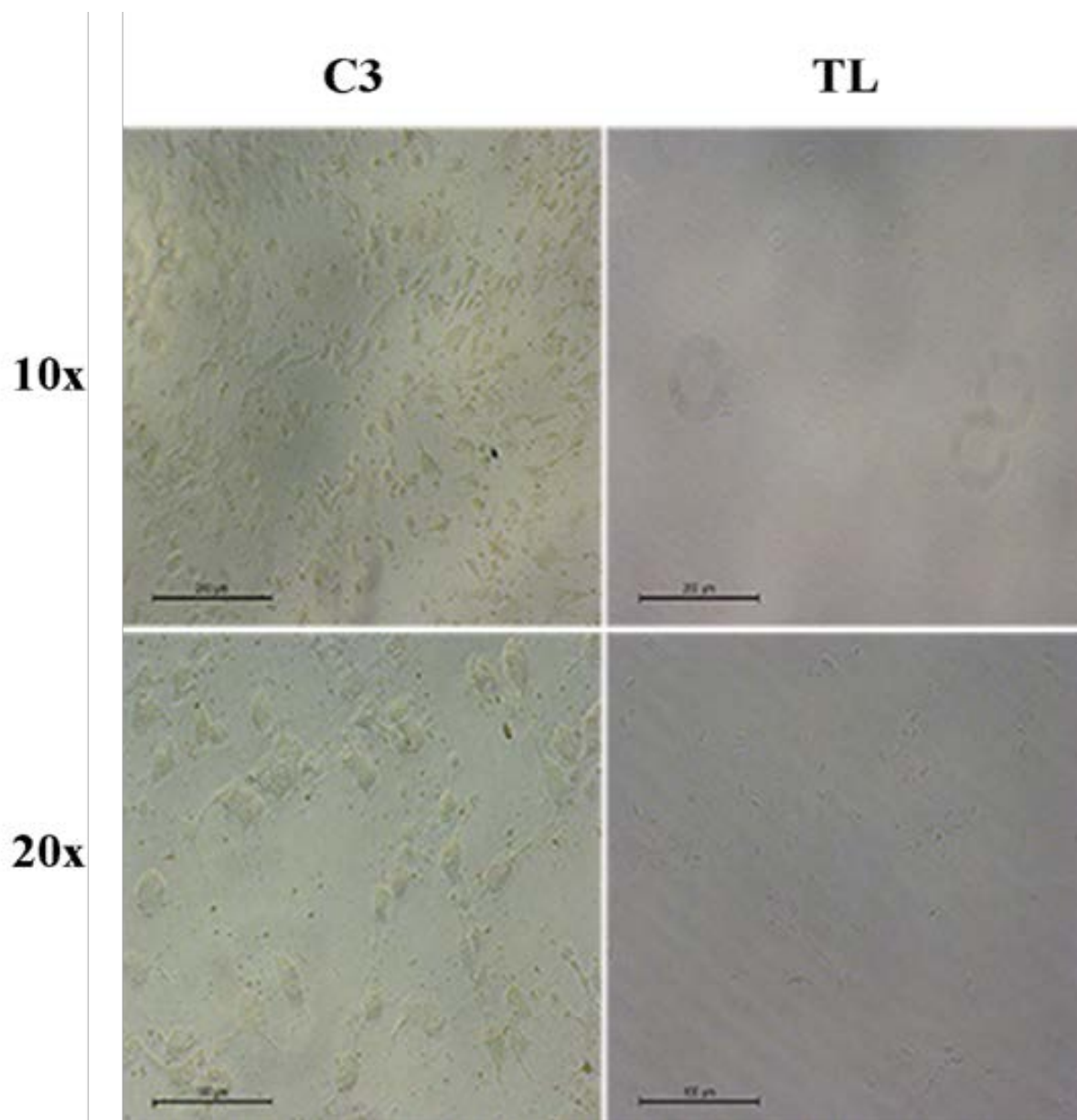
Análises qualitativas das imagens de microscopia de campo claro confirmaram que os microcristais testados não alteraram a morfologia das células FGH na concentração capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* (CFM). Por outro lado, os grupos referentes à maior concentração de microcristais (C3) e ao controle de morte (TL) produziram lise e alteração morfológica nas células FGH (Figura 6A e 6B para α -Ag₂WO₄ e Figura 7A e 7B para β -Ag₂MoO₄).

Figura 6A - Registro microscópico em campo claro de células em monocamada para $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. Comparação da morfologia das células fibroblastos em monocamadas, após 24 h em contato com o $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, nas concentrações C1 e C2 com os grupos controle negativo (DMEM). As imagens foram adquiridas em aumentos de 10x e 20x.



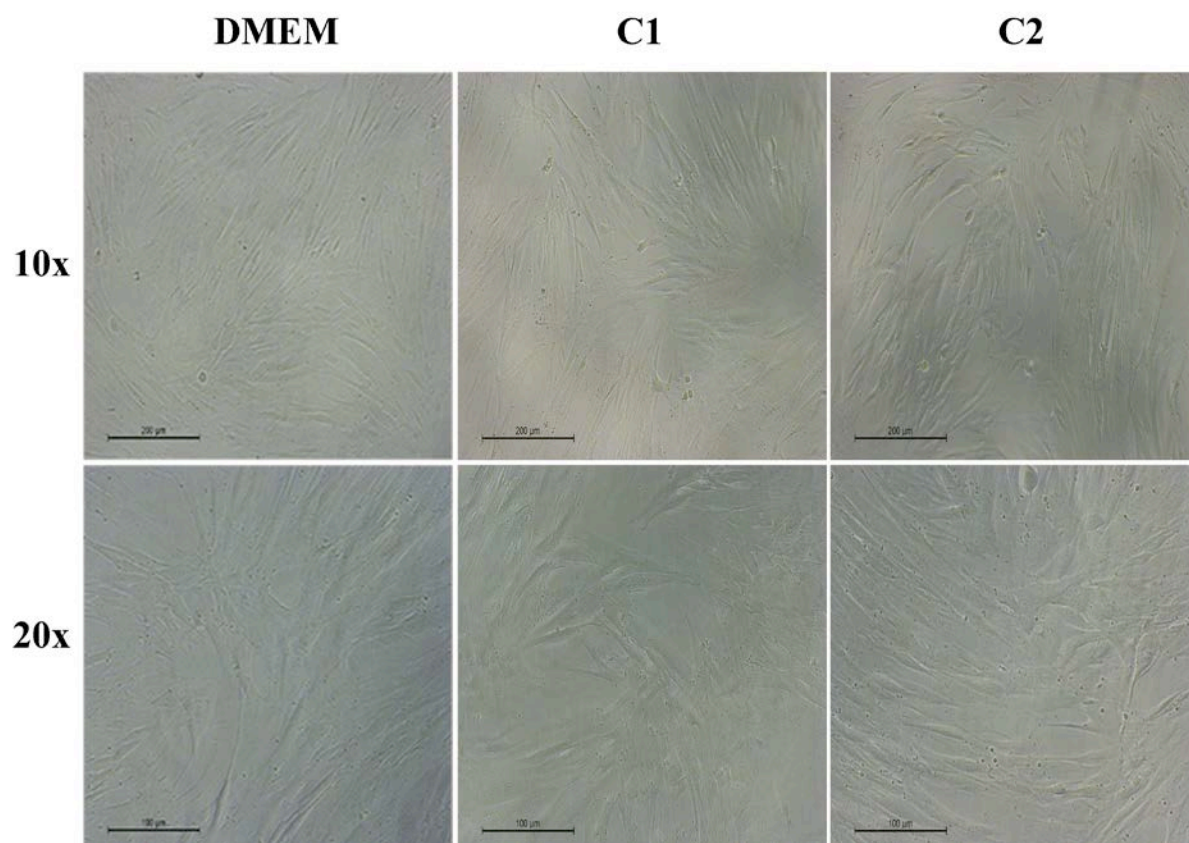
Fonte: Elaboração própria.

Figura 6B - Registro microscópico em campo claro de células em monocamada para $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. Comparação da morfologia das células fibroblastos em monocamadas, após 24 h em contato com o $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, na concentração C3 com o grupo controle positivo (TL). As imagens foram adquiridas em aumentos de 10x e 20x.



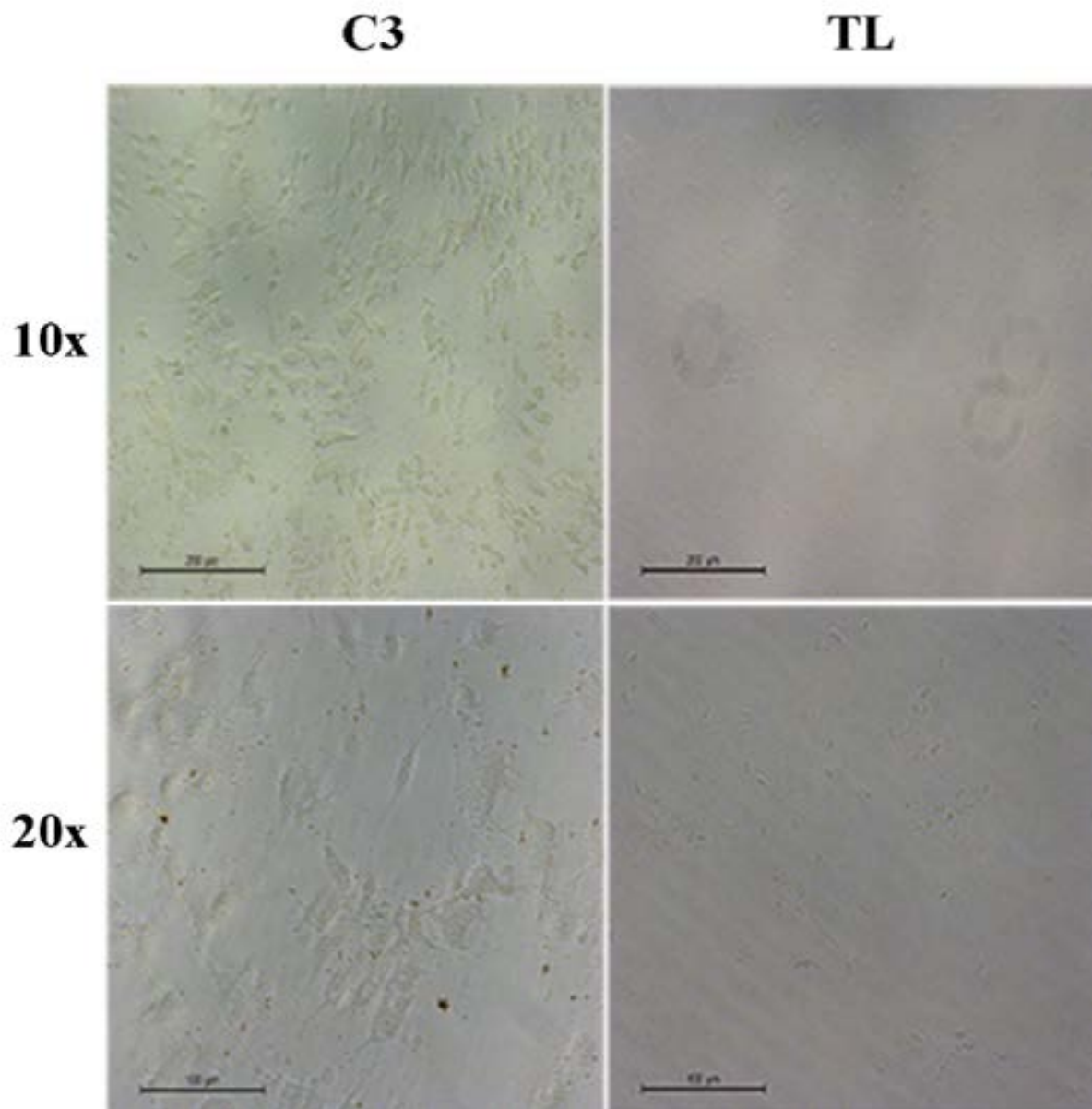
Fonte: Elaboração própria.

Figura 7A - Registro microscópico em campo claro de células em monocamada para $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$. Comparação da morfologia das células fibroblastos em monocamadas, após 24 h em contato com o $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$, na concentração C3 com o grupo controle positivo (TL). As imagens apresentam aumentos de 10x e 20x.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 7B - Registro microscópico em campo claro de células em monocamada para $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$. Comparação da morfologia das células fibroblastos em monocamadas, após 24 h em contato com o $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$, na concentração C3 com o grupo controle positivo (TL). As imagens foram adquiridas em aumentos de 10x e 20x.

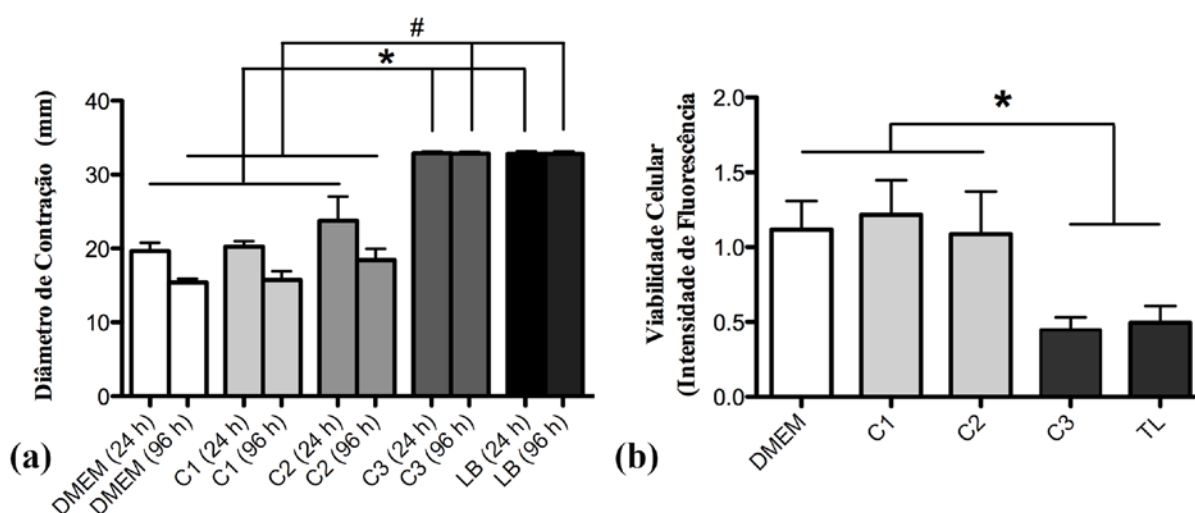


Fonte: Elaboração própria.

5.3 Efeito dos Microcristais no Reparo Tecidual

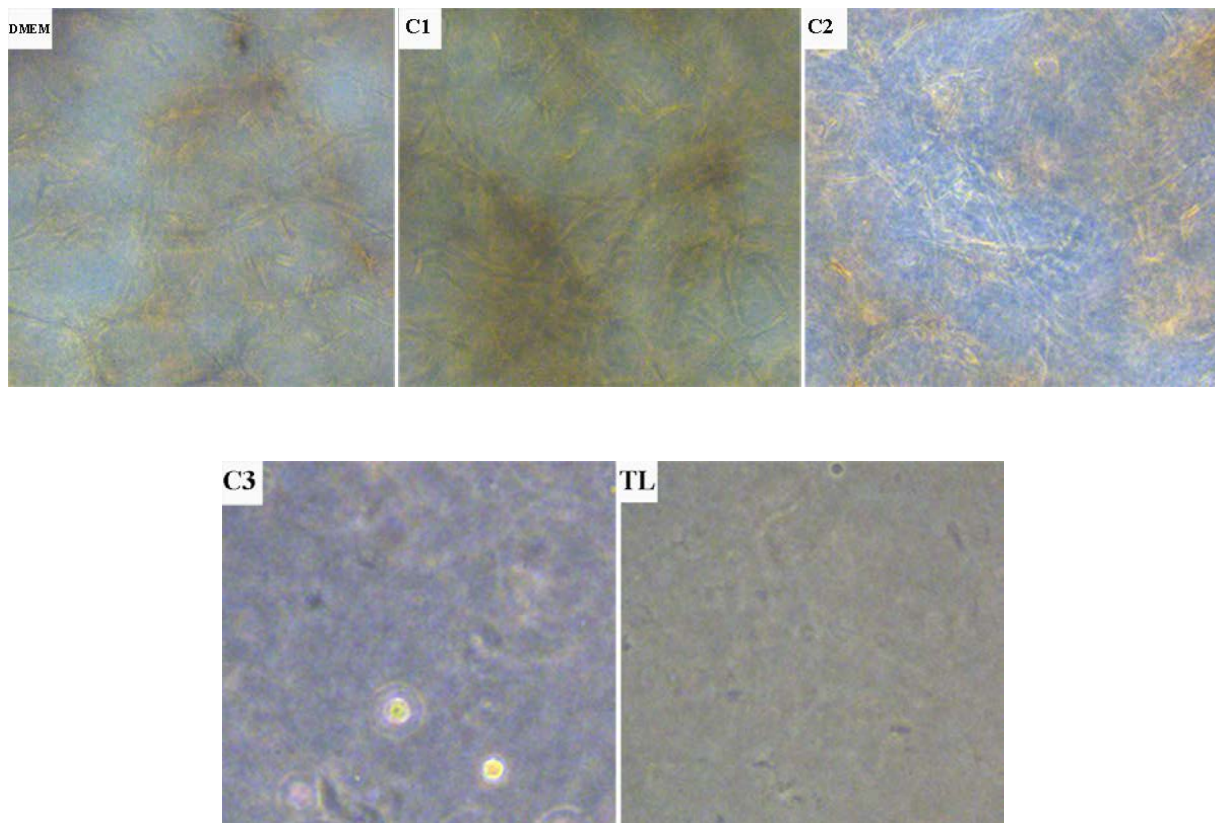
Para investigar o efeito dos microcristais no reparo tecidual, ambos $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ e $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ foram acrescentados nas respectivas concentrações durante a confecção do equivalente dermal, a viabilidade celular e o diâmetro de contração das matrizes de colágeno foram mensurados e comparados com os controles. Em relação ao $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, ambas as análises mostraram que a concentração de interesse (C2) não agrediu as células do equivalente dermal, mantendo a viabilidade semelhante ao grupo controle negativo, mesmo após 96 h de incubação. O mesmo foi observado em relação ao diâmetro de contração. Da mesma forma, a concentração C2 não interferiu na velocidade da contração da matriz de colágeno, indicando uma atividade dinâmica por parte dos fibroblastos sem aparente alteração, semelhante ao grupo controle negativo (Figura 8). A morfologia das células se apresentou semelhante ao grupo onde as células foram somente cultivadas em meio de cultura, validando os achados quantitativos (Figura 9A).

Figura 8 - Dados de diâmetro de contração do equivalente dermal **(a)** e viabilidade celular após 96 h mediante o ensaio MTT **(b)** para $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. As análises estatísticas foram realizadas por meio do GraphPad Prism versão 5.0 c. Os dados estão apresentados como média \pm DP (n=6). **(a)** Teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos foi utilizado com teste Dunn de comparações múltiplas. (*) Nota-se uma ausência de contração nos grupos C3 e TL quando comparado com os grupos controle negativo DMEM, C1 e C2. **(b)** análise de variância (ANOVA), complementada com o teste de Tukey. *p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 9A - Análise microscópica em equivalente dermal para $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. As imagens em campo claro mostram não haver alterações morfológicas nas concentrações C1 e C2 em comparação com o controle negativo (DMEM). Por outro lado, a concentração C3 demonstra lise da membrana plasmática com focos de células mortas. As imagens foram adquiridas em aumento de 10x.



Fonte: Elaboração própria

Contrariando nossos achados anteriores, o $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ interferiu diretamente na viabilidade dos fibroblastos gengivais durante a confecção da matriz de colágeno, mostrando ausência de contração do equivalente dermal ainda nas primeiras 24 horas (Figura 9B). Por este motivo não prosseguimos com a investigação nos testes subsequentes. A partir deste momento, os experimentos seguiram apenas com o $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$.

Figura 9B - Análise microscópica em equivalente dermal para $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$. As imagens em campo claro mostram não haver alterações morfológicas na concentração C1 em comparação com o controle negativo (DMEM). Por outro lado, as concentrações C2 e C3 demonstram lise da membrana plasmática com focos de células mortas. As imagens foram adquiridas em aumento de 10x. (continua)

DMEM

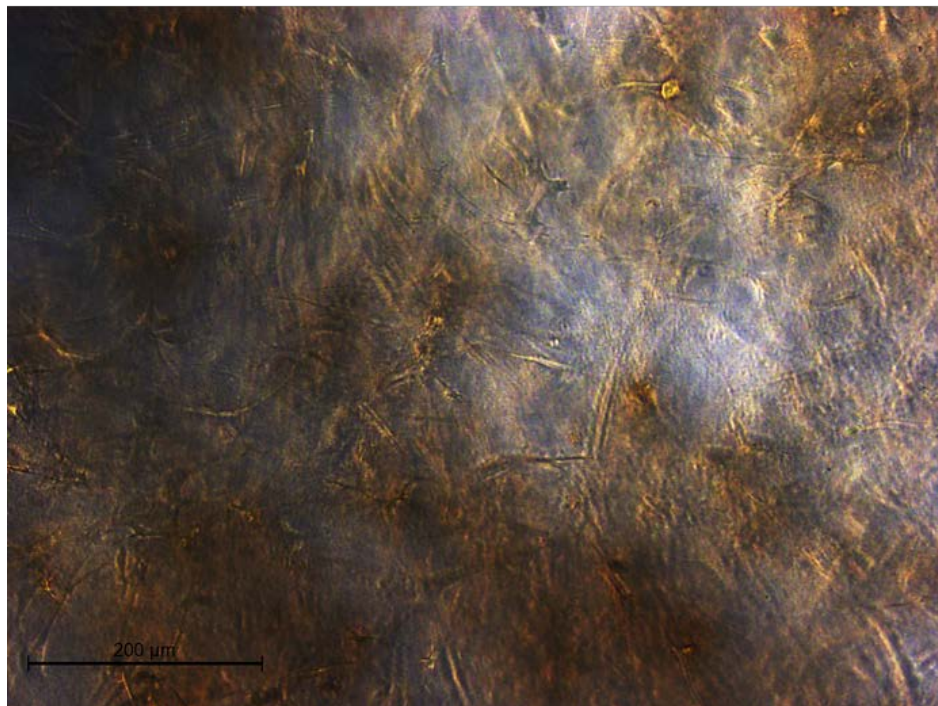
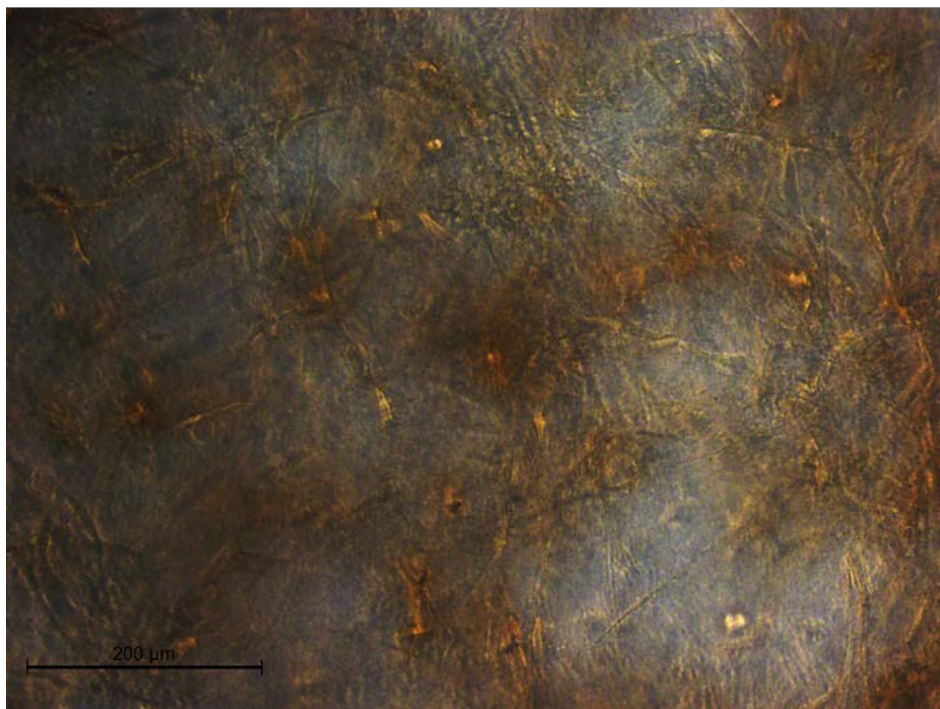


Figura 9B - Análise microscópica em equivalente dermal para $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$. As imagens em campo claro mostram não haver alterações morfológicas na concentração C1 em comparação com o controle negativo (DMEM). Por outro lado, as concentrações C2 e C3 demonstram lise da membrana plasmática com focos de células mortas. As imagens foram adquiridas em aumento de 10x. (continuação)

C1



C2

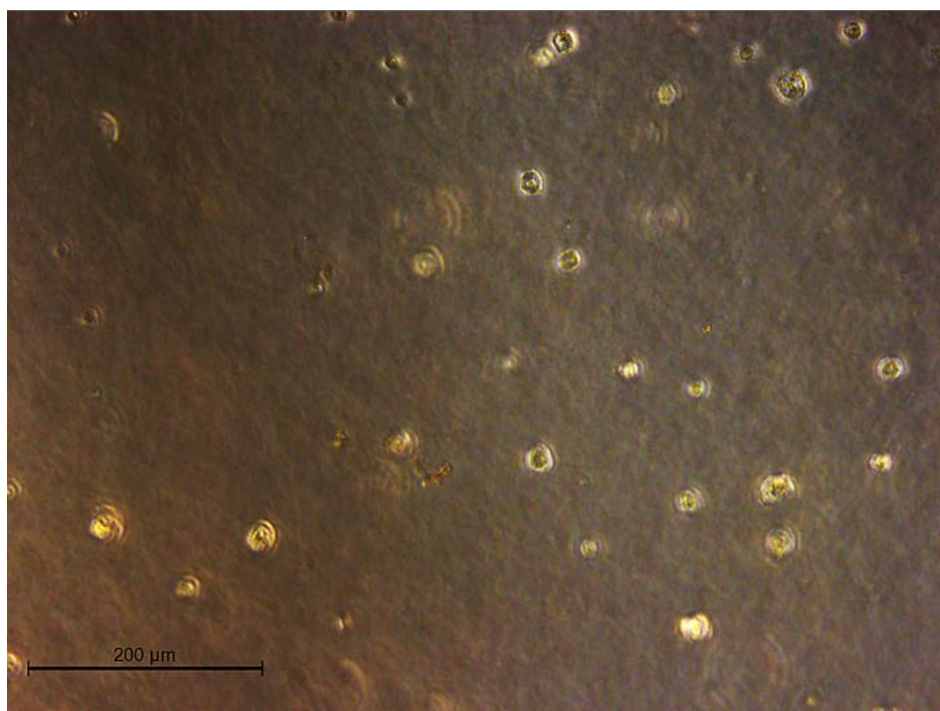
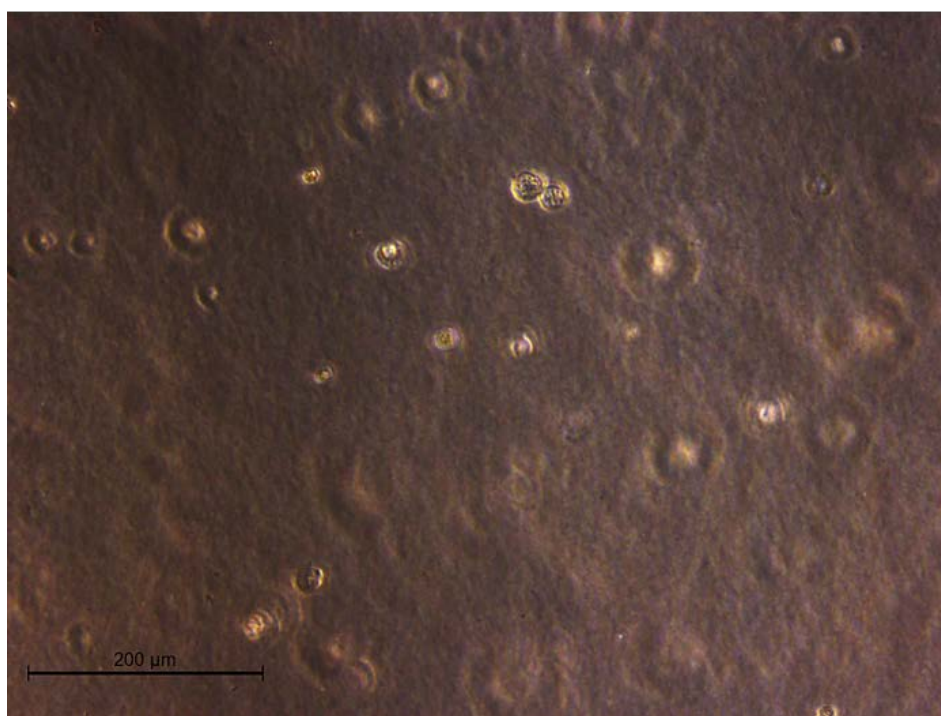


Figura 9B - Análise microscópica em equivalente dermal para $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$. As imagens em campo claro mostram não haver alterações morfológicas na concentração C1 em comparação com o controle negativo (DMEM). Por outro lado, as concentrações C2 e C3 demonstram lise da membrana plasmática com focos de células mortas. As imagens foram adquiridas em aumento de 10x. (conclusão)

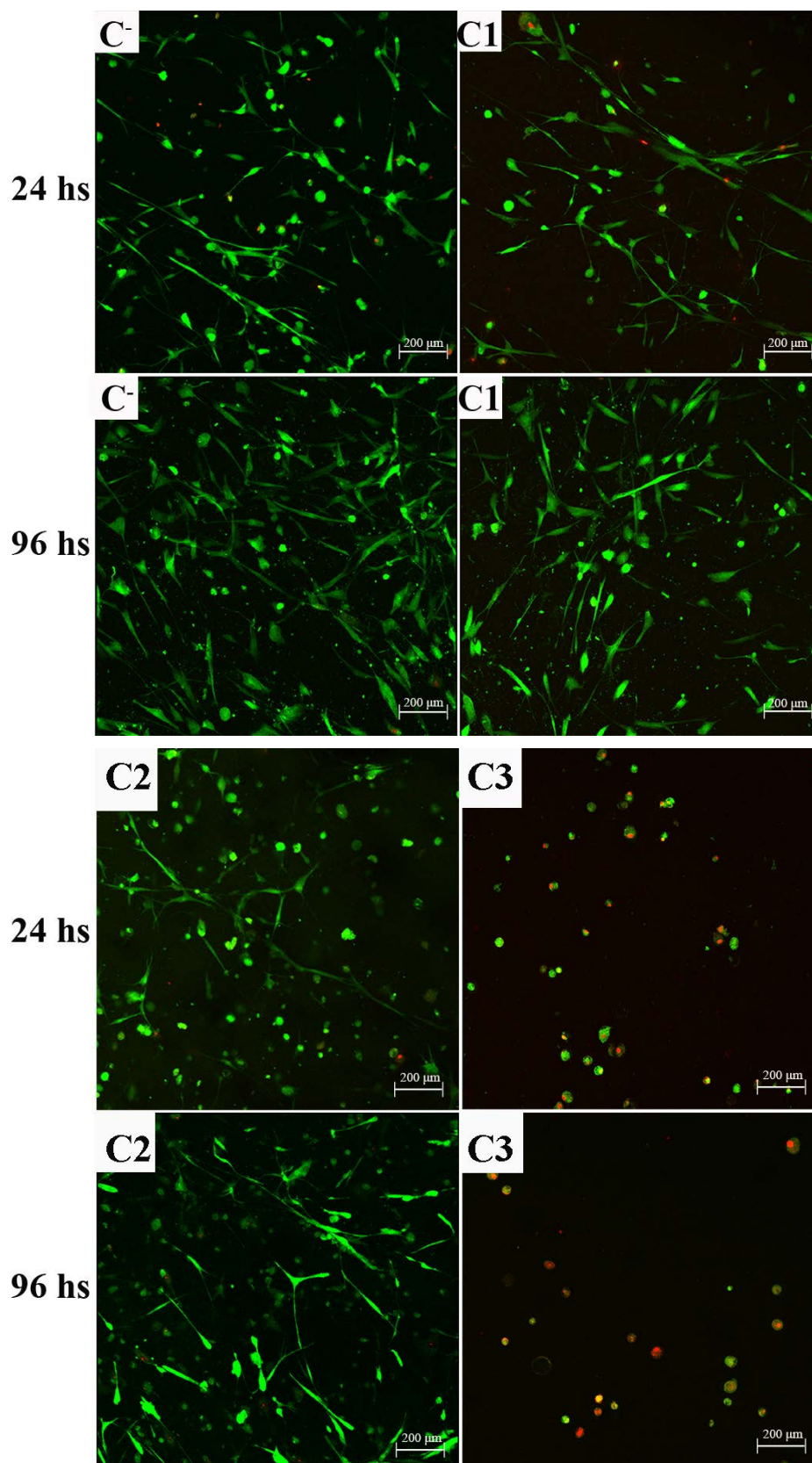
C3



Fonte: Elaboração própria.

Para confirmar o efeito do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ na proliferação dos fibroblastos no interior da matriz de colágeno, as células foram incubadas com marcadores bioquímicos de proliferação e morte e/ou dano celular: CFSE e IP, respectivamente, por 24 e 96 h. Imagens de microscopia revelaram que as células fibroblastos não foram afetadas pelos microcristais na concentração C2, expressando fluorescência verde mesmo após longo tempo de exposição ao $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ (Figura 10). Ao contrário da concentração C3, na qual foi possível observar alteração de morfologia celular e fluorescência vermelha ainda nas primeiras 24 h de incubação.

Figura 10 - Efeito do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ nas células FGH no interior do equivalente dermal após 24 h e 96 h de incubação.



Fonte: Elaboração própria.

5.4 Efeito do α -Ag₂WO₄ na Morfologia Celular

Para confirmar a ausência de toxicidade do α -Ag₂WO₄ na morfologia das células em monocamadas, imagens mais precisas do efeito do microcristal em diferentes concentrações foram obtidas por meio da MEV (Figura 11 A, B e C).

Figura 11 - Análise morfológica das células FGH em monocamada após 24 horas de incubação com α -Ag₂WO₄. **(A)** Imagem mostra a morfologia celular conservada para o grupo C1 em comparação com o controle negativo (DMEM). **(B)** Imagem mostra a morfologia celular conservada para o grupo C2 ao contrário do grupo C3, o qual apresenta restos celulares com pequenas partículas presumivelmente dos microcristais. As imagens foram adquiridas em 70x e 100x. **(C)** Imagens em maior aumento, 250x e 700x, foram registradas para os grupos controle e C3 a fim de destacar as alterações morfológicas encontradas. (continua)

(A)

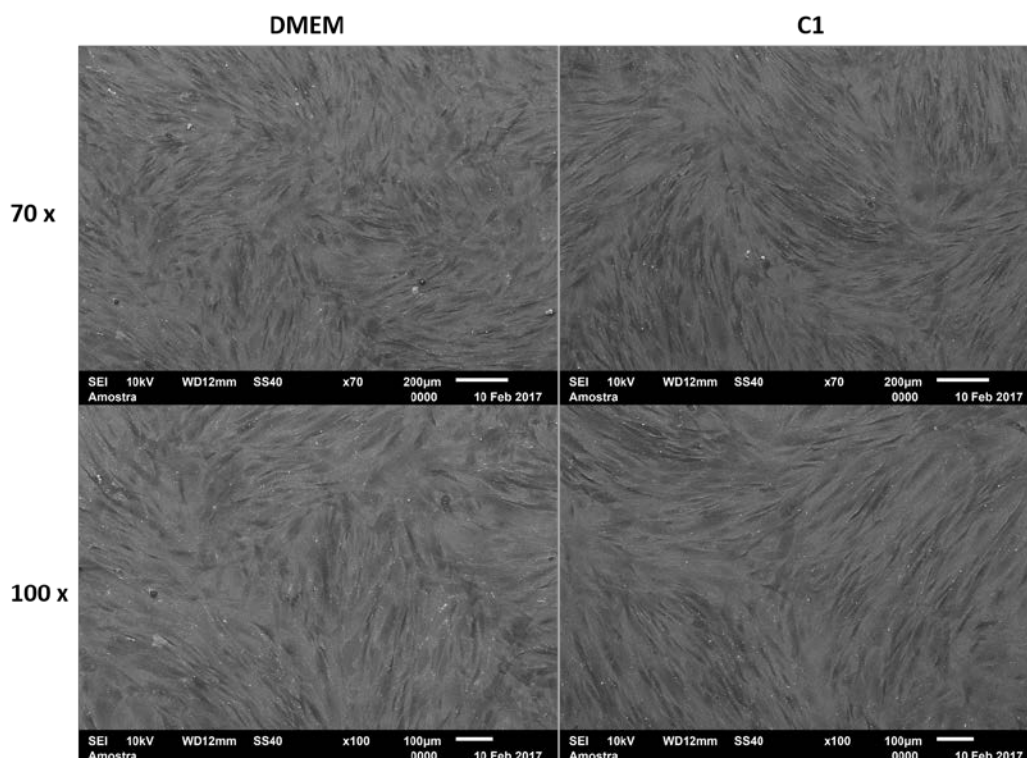


Figura 11 - Análise morfológica das células FGH em monocamada após 24 horas de incubação com $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. **(A)** Imagem mostra a morfologia celular conservada para o grupo C1 em comparação com o controle negativo (DMEM). **(B)** Imagem mostra a morfologia celular conservada para o grupo C2 ao contrário do grupo C3, o qual apresenta restos celulares com pequenas partículas presumivelmente dos microcristais. As imagens foram adquiridas em 70x e 100x. **(C)** Imagens em maior aumento, 250x e 700x, foram registradas para os grupos controle e C3 a fim de destacar as alterações morfológicas encontradas. (continuação)

(B)

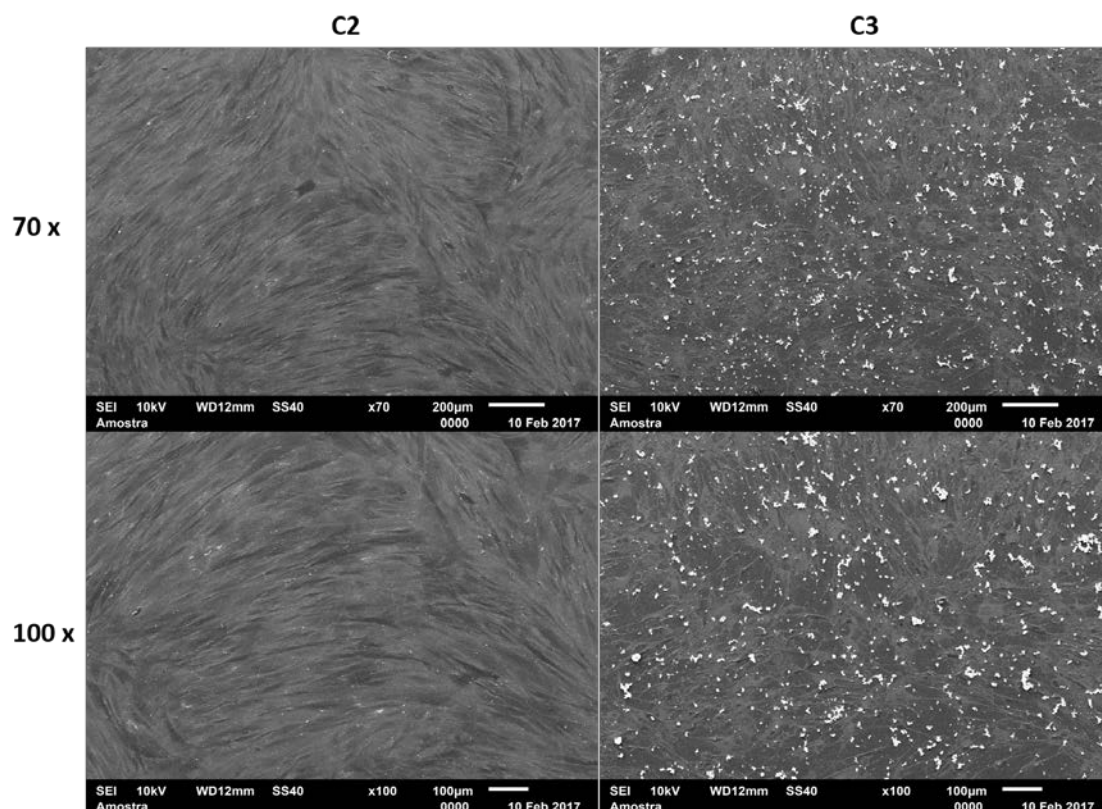
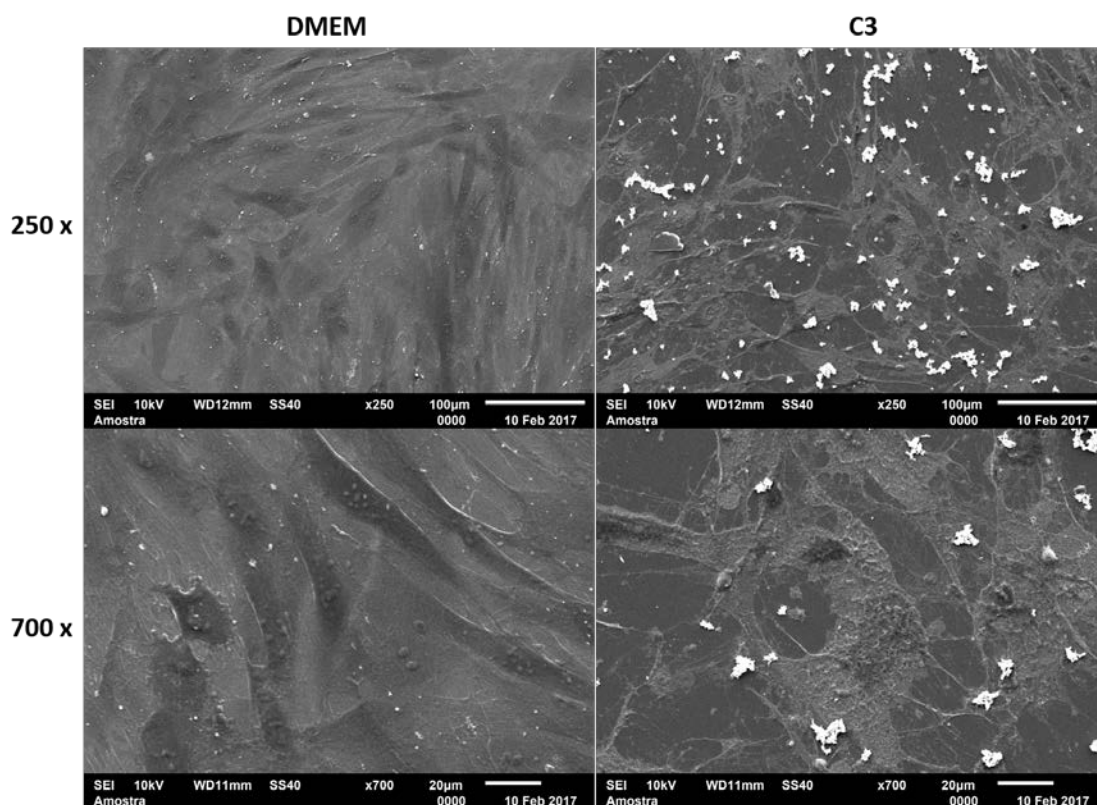


Figura 11 - Análise morfológica das células FGH em monocamada após 24 horas de incubação com $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. **(A)** Imagem mostra a morfologia celular conservada para o grupo C1 em comparação com o controle negativo (DMEM). **(B)** Imagem mostra a morfologia celular conservada para o grupo C2 ao contrário do grupo C3, o qual apresenta restos celulares com pequenas partículas presumivelmente dos microcristais. As imagens foram adquiridas em 70x e 100x. **(C)** Imagens em maior aumento, 250x e 700x, foram registradas para os grupos controle e C3 a fim de destacar as alterações morfológicas encontradas. (conclusão)

(C)

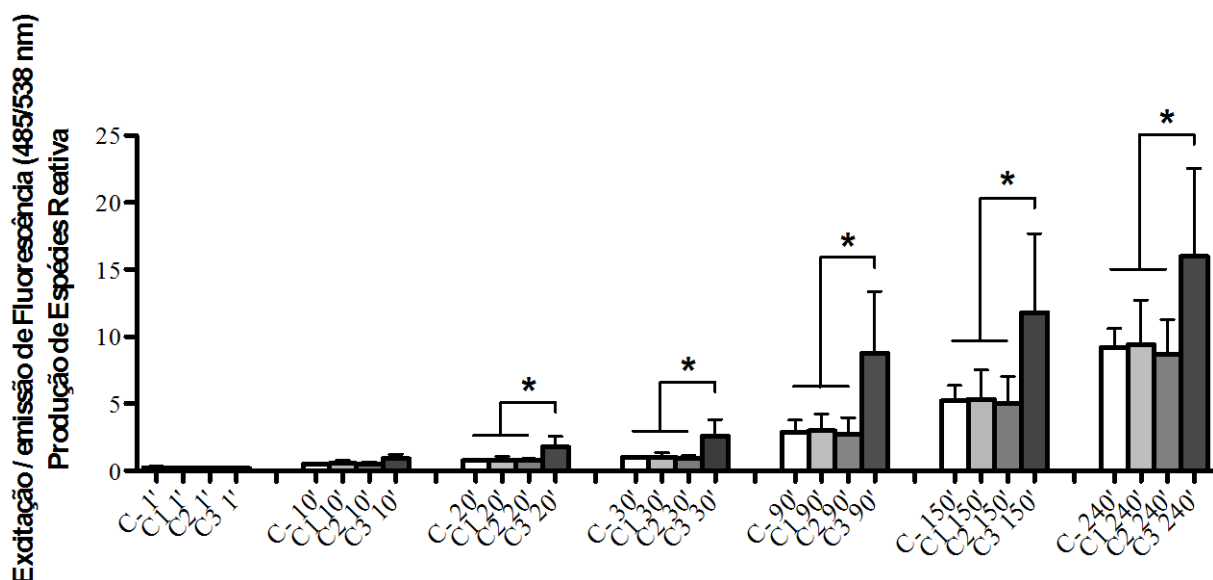


Fonte: Elaboração própria.

5.5 Efeito do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ na Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

O efeito do Ag_2WO_4 na produção de espécies reativas de oxigênio foi avaliado em diferentes tempos, e acompanhados com as imagens em microscopia de fluorescência. Os resultados demonstraram claramente a geração de espécies reativas intensificada nas células em contato com os microcristais 10 vezes mais concentrado. Em relação à concentração de interesse (C2), os níveis de radicais livres inespecíficos foram semelhantes aos grupos controle negativo e C1, independente do momento experimental (Figura 12). A intensidade da fluorescência produzida em ambas as concentrações C1 e C2 não diferiu do controle negativo (Figura 13).

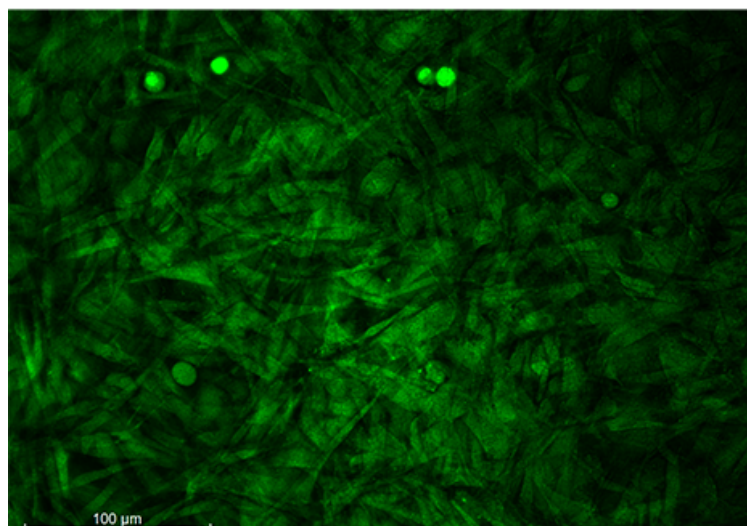
Figura 12 - Produção de espécies reativas do tipo inespecífico, em diferentes tempos. A diferença estatística na liberação de radicais livres pelas células expostas ao microcristal $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ na concentração C3 em relação aos demais grupos foi mensurada de acordo com a análise de variância “one way” (ANOVA), complementada pelo teste post hoc de Tukey, utilizando GraphPad Prism versão 5.0c. Os dados estão apresentados como a média \pm DP (n = 8). *p <0,05 foi considerado estatisticamente significativo.



Fonte: Elaboração própria

Figura 13 - Análise microscópica de fluorescência para células em monocamada. A intensidade da fluorescência indica similaridade na produção de espécies reativas entre o grupo controle negativo, C1 e C2. As imagens foram registradas nos primeiros 10 minutos após o contato com os microcristais. (continua)

DMEM



C1

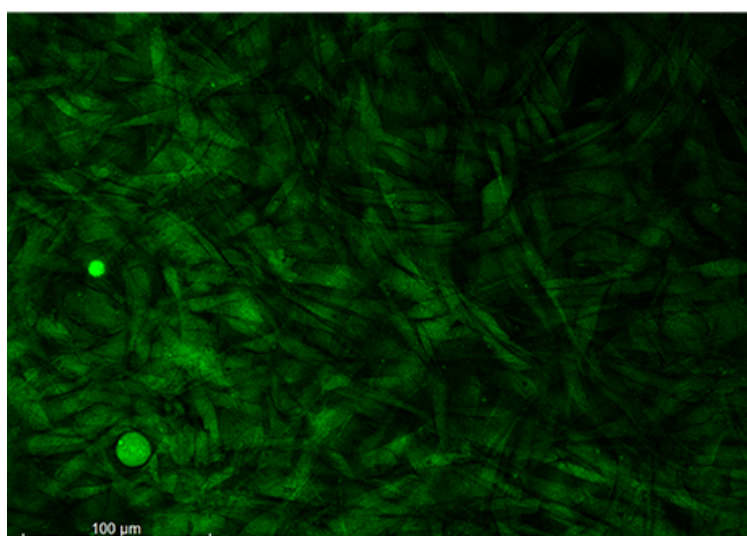
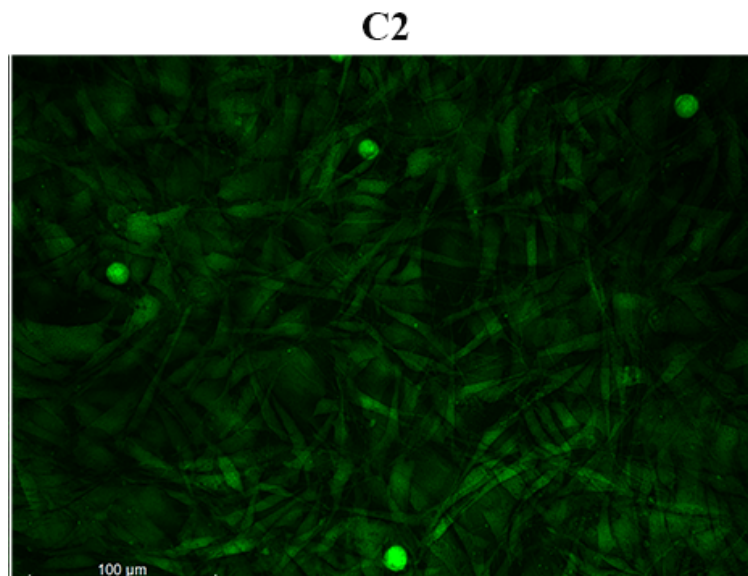


Figura 13 - Análise microscópica de fluorescência para células em monocamada. A intensidade da fluorescência indica similaridade na produção de espécies reativas entre o grupo controle negativo, C1 e C2. As imagens foram registradas nos primeiros 10 minutos após o contato com os microcristais. (conclusão)

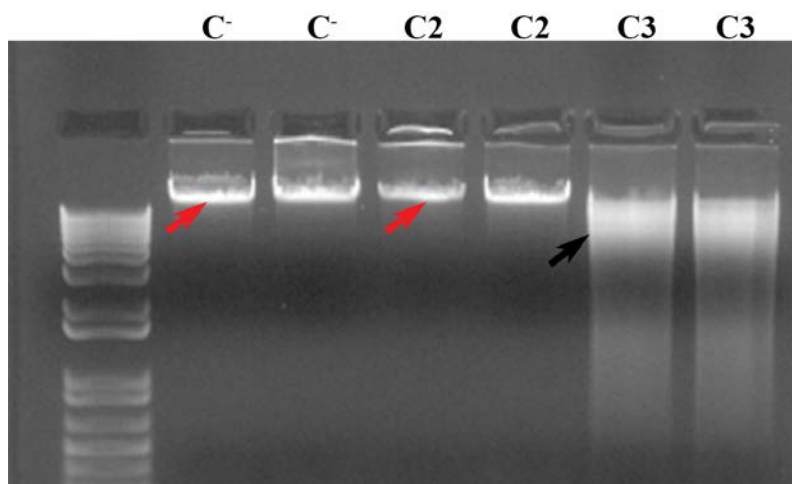


Fonte: Elaboração própria.

5.6 Efeito do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ na Integridade do DNA

Os radicais livres são reconhecidos por agredir tanto as bases nitrogenadas quanto os açúcares pertencentes a molécula do DNA e, assim, estimular ligações cruzadas a outras moléculas, inibindo a replicação deste ácido nucleico (Sies¹⁰⁹, 1993). Neste contexto, analisamos de forma específica, se o $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ estaria comprometendo a integridade do DNA genômico das células, após 24 h em contato. Em concordância com os resultados obtidos nos experimentos anteriores, a banda referente ao DNA extraído das células incubadas com a concentração C2, se manteve única e intacta, semelhante ao grupo controle onde as células foram cultivadas na ausência do microcristal. Por outro lado, em uma concentração já definida como citotóxica (C3), a presença de várias bandas representou o DNA fragmentado, ou seja, a substância age rompendo a molécula em diferentes sítios produzindo fragmentos contendo variado número de bases nitrogenadas (Figura14).

Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose para separação dos fragmentos do DNA. Os grupos controle negativo (C-) e os grupos concentração C2 apresentaram apenas uma banda, confirmando que o Ag_2WO_4 na concentração C2 não comprometeu a integridade do DNA. O grupo controle positivo que foi a concentração C3, demonstra a presença de diferentes bandas, indicando a degradação da molécula analisada. As imagens são representativas de experimentos realizados em duplicata e em duas ocasiões distintas.



Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Materiais com propriedades antimicrobianas tem sido foco de estudos na área odontológica em uma tentativa de combater doenças orais e minimizar a prescrição de antibióticos (Burgers et al.²¹, 2009; Cao et al.²², 2011; de Castro et al.³⁴⁻³⁵, 2016). Dentre os metais descritos na literatura, os microcristais contendo tungstênio e molibdênio tem demonstrado otimizar a capacidade fungicida da prata contra a *C. albicans*, (Fabbro et al.³⁹, 2016; Foggi et al.⁴¹, 2017) em concentrações de 15 a 900 vezes inferior aos valores terapêuticos da prata reportado como baixos por estudos laboratoriais (Kim et al.⁶²⁻⁶³, 2008, 2010; Kawata et al.⁶⁰, 2009; Kaba, Egorova⁵⁹, 2015). Embora as propriedades antimicrobianas destes microcristais tenham sido preservadas mesmo na presença de baixa concentração de prata, pouco se sabia sobre o possível impacto destes componentes em células humanas. Neste estudo, demonstramos, por meio de diferentes métodos, a ausência de toxicidade dos microcristais de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ quando em contato direto com fibroblastos gengivais. Mesmo após longo período de exposição, o $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ não afetou a viabilidade e a morfologia das células em matriz de colágeno em 3-D. Importaneamente, a produção de espécies reativas produzidas na concentração de interesse também não interferiu com a integridade do DNA. Ao contrário das informações obtidas para com o molibdato de prata, o qual se mostrou altamente citotóxico provocando morte das células ainda durante as primeiras horas da confecção da matriz de colágeno.

A utilização da prata na síntese dos microcristais em questão se deve as importantes características antimicrobianas que este metal detém. Dentre os metais com aplicabilidade na área da saúde, a prata também é classificada como não tóxica a depender da concentração manipulada (Zhang et al.¹³¹, 2014; Kaba, Egorova⁵⁹, 2015). A preocupação com os possíveis riscos à saúde pública instigou a determinação de um valor limite de exposição permissível a este metal, recomendado como sendo de $0,01 \text{ mg/m}^3$ pelo Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional (Echt et al.³⁷, 2011).

Estudos laboratoriais posteriores também foram realizados afim de registrar as concentrações citotóxicas envolvendo AgNPs e revelaram valores não recomendáveis entre 222 a 362 mg/kg (Stensberg et al.¹¹⁵, 2011). Ao contrário das concentrações de nanomateriais contendo prata, reportadas na literatura como preocupante para a saúde pública (Maillard, Hartemann⁷⁶, 2012; Zhang et al.¹³¹, 2014), os microcristais de α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄ se destacam pela capacidade de manter as propriedades antimicrobianas mesmo apresentando quantidades de prata, que neste caso se apresenta de forma oxidada, em torno de 0,033 µg/mL e 0,083 µg/mL, respectivamente. Este efeito antimicrobiano pode ser atribuído ao arranjo dos átomos de Ag nos microcristais o que por sua vez pode provocar interações eletrônicas e formação de radicais reativos (Roca et al.⁹⁹, 2015).

Embora seja sabido que o mecanismo de ação dos metais sobre microorganismos e células humanas se diferem, a ausência de toxicidade destes microcristais na concentração requerida para matar um fungo patogênico associado a infecções em geral, foi detalhadamente investigada neste estudo. Para isto, testes iniciais de citotoxicidade de acordo com os padrões da ISO 10993 foram primeiramente realizados em culturas de fibroblastos em monocamadas. O efeito dos microcristais sobre o metabolismo dos fibroblastos gengivais foi analisado após 24 horas de incubação e os resultados obtidos mostraram que, neste período crítico, ambos os componentes não interferiram na proliferação das células na C2. Resultados similares foram obtidos com AgNPs nas concentrações de 0,01 ug/mL até 10 ug/mL (Chan et al.²⁶, 2013; Herzog et al.⁵⁰, 2013), confirmando a quantidade de prata utilizada na CMF como baixa e não citotóxica. Por outro lado, em uma concentração dez vezes maior (C3), os microcristais afetaram a capacidade de proliferação celular e contribuíram para a morte dos fibroblastos. Estes resultados sugerem uma possível influência dos microcristais tungstênio e molibdênio no efeito citotóxico, já que a quantidade de prata na concentração C3, permaneceria inferior ao recomendado pela literatura (De Lima et al.³⁶, 2012; Krajewski et al.⁶⁶, 2013; Zhang et al.¹³¹, 2014).

Confirmada a ausência de toxicidade do α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄ em células em monocamadas na concentração C2, buscamos compreender se estes microcristais

também não seriam capazes de interferir na viabilidade dos fibroblastos simulando uma condição de reparação tecidual. Para este tipo de análise, modelo de matriz colágena tipo I contrátil tem sido muito utilizado pela possibilidade de prover informações referentes aos processos celulares (crescimento celular, morfologia, migração e interações) que ocorrem *in vivo* (Tamariz, Grinnell¹¹⁹, 2002). O modelo de equivalente dermal utilizado neste estudo (Bell¹⁴, 1979), avaliou o comportamento dos fibroblastos como células responsáveis por gerar forças mecânicas e permitir a contração do tecido de granulação e consequente cicatrização das feridas (Arora et al.⁵, 1999). Consistente com os dados obtidos em monocamada, o α -Ag₂WO₄ não interferiu na contração da matriz confeccionada na concentração C2 após um longo tempo de exposição. Análises subsequentes do metabolismo, proliferação e da morfologia celular mostraram a viabilidade das células mesmo após 96 h de incubação com o α -Ag₂WO₄. Por outro lado, o β -Ag₂MoO₄ apresentou alta toxicidade na C2 às células durante a confecção da matriz ainda nas primeiras 24 h. Este efeito foi primeiramente comprovado pela ausência de contração do gel, sendo este semelhante ao controle positivo. Alterações na morfologia denotando morte dos fibroblastos foram confirmadas por meio da microscopia de campo claro. Os efeitos citotóxicos do β -Ag₂MoO₄ na matriz de colágeno contraria os dados obtidos anteriormente e isto pode ser explicado pelo fato de os microcristais serem suspensos junto das células antes da polimerização do gel. Diferentemente dos testes em monocamada, em que os componentes são somente incubados após a organização das células no fundo da placa. Estes resultados também sugerem uma possível toxicidade do metal molibdênio, já tendo sido este reconhecido pelos potenciais efeitos à saúde humana a depender da dose utilizada (Vyskocil, Viau¹²⁸, 1999; Mendy et al.⁷⁸, 2012; Beltrán et al.¹⁶, 2014; Siddiqui et al.¹⁰⁸, 2015). Os resultados do β -Ag₂MoO₄ instigaram análises de microscopia para confirmar a viabilidade das células fibroblastos no interior da matriz de colágeno quando confeccionada na presença do α -Ag₂WO₄. O mecanismo de ação dos fluorescentes utilizados para a análise em questão, permite uma maior e mais precisa indicação da real condição das células no interior do gel em 3-D. No caso do CFSE, esta substância considerada estável e não fluorescente na forma inicial, apresenta grupos acetatos e um grupo funcional succinimidil éster na composição química. Quando em meio intracelular, enzimas naturalmente presentes no citoplasma de células

vivas, clivam os grupos acetatos gerando desta forma fluorescência verde (Lyons, Parish⁷⁵, 1994). Interessantemente, nesta nova forma, o CFSE se torna impermeável a estrutura externa celular, sendo capaz de manter a fluorescência por um maior período de tempo. As imagens obtidas após 24 e 96 horas foram consistentes em demonstrar a fluorescência verde do composto CFSE em células fibroblastos na concentração de interesse. Concomitante a estes resultados, a fluorescência vermelha, consequência da ligação do IP com ácidos nucleicos do DNA, foi somente observada para a concentração C3. Este fato confirma a integridade da membrana plasmática nas células fibroblastos na concentração C2 já que o IP é impermeável a estrutura que delimita as células vivas (Suzuki et al.¹¹⁸, 1997).

Uma vez que o β -Ag₂MoO₄ apresentou sinais negativos contra as células em matriz de colágeno, as análises sequenciais foram direcionadas apenas ao α -Ag₂WO₄. Neste momento, imagens mais precisas e em grande aumento registraram a ausência de alteração das células em monocamadas para a C2 de α -Ag₂WO₄. Considerando que os metais agem contra os micro-organismos por meio da produção de espécies reativas (Raghupathi et al.⁹⁸, 2011; Azam et al.⁹, 2012), para melhor compreender o efeito deste microcristal nas células humanas, também quantificamos a geração de ROS induzida pela concentração de interesse C2. A viabilidade celular na presença do α -Ag₂WO₄ pode estar relacionada ao fato deste microcristal não afetar demasiadamente a produção de ROS pelos fibroblastos. Análises quantitativas da fluorescência emitida pelas concentrações C1 e C2 não mostraram diferenças em comparação com o controle negativo, diferentemente da concentração C3. É importante mencionar também que se trata de um ensaio de ROS inespecífico o que significa que as espécies reativas produzidas podem também estar advindo dos microcristais (AshaRani et al.⁷, 2009; Kawata et al.⁶⁰, 2009). Para complementar as informações quantitativas, a intensidade da fluorescência dos grupos C1, C2 e C3 foi também comparada ao controle por meio de imagens. Interessantemente, nenhuma fluorescência foi obtida para a concentração C3 após os primeiros 10 minutos de exposição das células aos microcristais. Isto pode ser explicado pelo fato de as células estarem mortas neste período devido ao forte efeito citotóxico do α -Ag₂WO₄ quando em altas concentrações.

A produção não controlada de espécie reativa pelas células também está associada a possibilidade de dano ao DNA. De acordo com Kawata et al.⁶⁰ (2009) doses inferiores a 1,0 µg/mL de AgNPs podem não apresentar citotoxicidade óbvia às células humanas, mas causar danos à molécula que contém as instruções genéticas fundamentais à vida e aos cromossomos, estimulando a expressão de um grande número de genes relacionados ao reparo do DNA. Considerando a não alteração da molécula de DNA como condição mandatória de um material para futuras aplicações na área da saúde, nossos dados corroboraram com as informações obtidas até então e demonstraram que a produção de ROS produzida na concentração C2 não interferiu na integridade do DNA dos fibroblastos.

Este estudo fornece informações valiosas em relação ao comportamento dos fibroblastos frente a exposição à ambos os microcristais. Não obstante, os resultados promissores encontrados para o α -Ag₂WO₄ instigam um esforço contínuo para obter uma melhor compreensão dos potenciais efeitos destes microcristais na resposta inflamatória. Para isto, estudos sequenciais em animais são requeridos para clarificar a ação do componente inorgânico e possibilitar futuras aplicações.

7 CONCLUSÃO

Baseados nos resultados obtidos e considerando a metodologia utilizada neste estudo, observou-se que o tungstato de prata na concentração C2 (7,81 µg/mL) ou CFM para *C. albicans*, não apresentou propriedades tóxicas para as células fibroblastos em monocamada e em matriz de colágeno. Por outro lado, embora o molibdato de prata na concentração C2 não tenha interferido na proliferação das células quando em monocamadas, afetou diretamente a viabilidade dos fibroblastos durante a confecção da matriz de colágeno.

REFERÊNCIAS*

1. Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain SM, Schlaager JJ, et al. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 233(3): 404–10.
2. Altarawneh S, Bencharit S, Mendoza L, Curran A, Barrow D, Barros S. Clinical and histological findings of denture stomatitis as related to intraoral colonization patterns of *Candida albicans*, Salivary flow, and dry mouth. *J Prosthodont*. 2013; 22(1): 13-22.
3. Anandhakumar S, Raichur AM. Polyelectrolyte/silver nanocomposite multilayer films as multifunctional thin film platforms for remote activated protein and drug delivery. *Acta Biomater*. 2013; 9(11): 8864–74.
4. Arora AK, Nithya R, Misra S, Yagi T. Behavior of silver molybdate at high-pressure. *J Solid State Chem*. 2012; 196: 391-7.
5. Arora PD, Narani N, McCulloch CA. The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor-beta induction of alpha-smooth muscle actin in fibroblasts. *Am J Pathol*. 1999; 154(3): 871– 82.
6. Artym VV, Matsumoto K. Imaging cells in three-dimensional collagen matrix. *Curr Protoc Cell Biol*. 2010 Sep; Chapter: Unit 10.18. 1-20. doi: 10.1002/0471143030.cb1018s48.
7. AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*. 2009; 3(2): 279-90.
8. Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol*. 2009; 28(8): 405–11.
9. Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan MS, Habib SS, Memic A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7: 6003-9. doi: 10.2147 / IJN.S35347.
10. Baillie GS, Douglas LJ. *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents. *Methods Enzymol*. 1999; 310:644–56.
11. Baillie GS, Douglas LJ. Iron-limited biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(8): 2146-9.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

12. Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 95(1):51-9.
13. Beer C, Foldbjerg R, Hayashi Y, Sutherland DS, Autrup H. Toxicity of silver nanoparticles - nanoparticle or silver ion? *Toxicol Lett.* 2012; 208(3):286-92.
14. Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; 76(3): 1274–8.
15. Bello YM, Falabella AF, Eaglstein WH. Tissue-engineered skin. Current status in wound healing. *Am J Clin Dermatol.* 2001; 2(5):305-13.
16. Beltrán A, Gracia L, Longo E, Andrés J. First-principles study of pressure-induced phase transitions and electronic properties of Ag_2MoO_4 . *J. Phys Chem C.* 2014; 118(7): 3724-32.
17. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2006; 9(6): 588-94.
18. Boyce ST, Ham RG. Cultivation, frozen storage, and clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in serum-free media. *J Tissue Cult Methods.* 1985; 9(2): 83 - 93.
19. Budtz-Jorgensen E, Lombardi T. Antifungal therapy in the oral cavity. *Periodontol 2000.* 1996; 10: 89–106.
20. Budtz-Jorgensen E. Ecology of *Candida*-associated denture stomatitis. *Microb Ecol Health Dis.* 2000; 12(3):170–85.
21. Burgers R, Eidt A, Frankenberger R, Rosentritt M, Schweikl H, Handel G, et al. The anti-adherence activity and bactericidal effect of microparticulate silver additives in composite resin materials. *Arch Oral Biol.* 2009; 54(6): 595-601.
22. Cao H, Liu X, Meng F, Chu PK. Biological actions of silver nanoparticles embedded in titanium controlled by micro-galvanic effects. *Biomaterials.* 2011; 32(3): 693-705.
23. Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *Phys Chem B.* 2008; 112(43):13608-19.
24. Carlson MA, Longaker MT. The fibroblast-populated collagen matrix as a model of wound healing: a review of the evidence. *Wound Repair Regen.* 2004; 12(2): 134-47.

25. Cavalcante LS, Almeida MA, Avansi W, Tranquilin RL, Longo E, Batista NC, et al. Cluster coordination and photoluminescence properties of alpha-Ag₂WO₄ microcrystals. *Inorg Chem* 2012; 51(20):10675-87.
26. Chan FK, Moriwaki K, De Rosa MJ. Detection of necrosis by release of Lactate Dehydrogenase (LDH) activity. *Methods Mol Biol.* 2013; 979: 65–70. doi: 10.1007/978-1-62703-290-2_7.
27. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*, 2001; 183(18): 5385–94.
28. Chandra J, Mukherjee PK. *Candida* biofilms: development, architecture, and resistance. *Microbiol Spectr.* 2015; 3(4) doi: 10.1128/microbiolspec MB-0020-2015.
29. Chandra J, Zhou G, Ghannoum MA. Fungal biofilms and antimycotics. *Curr Drug Targets.* 2005; 6(8): 887-94.
30. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.* 2001; 80(3): 903–8.
31. Choi O, Hu Z. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environ Sci Technol.* 2008; 42(12):4583-8.
32. Cooper ML, Boyce ST, Hansbrough JF, Foreman TJ, Frank DH. Cytotoxicity to cultured human keratinocytes of topical antimicrobial agents. *J Surg Res.* 1990; 48(3): 190-5.
33. Dallon JC, Ehrlich HP. A review of fibroblast-populated collagen lattices. *Wound Repair Regen.* 2008; 16(4): 472-9.
34. De Castro DT, Valente ML, Agnelli JA, Lovato da Silva CH, Watanabe E, Siqueira RL, et al. In vitro study of the antibacterial properties and impact strength of dental acrylic resins modified with a nanomaterial. *J Prosthet Dent.* 2016; 115(2): 238-46.
35. De Castro DT, Valente ML, da Silva CH, Watanabe E, Siqueira RL, Schiavon MA, et al. Evaluation of antibiofilm and mechanical properties of new nanocomposites based on acrylic resins and silver vanadate nanoparticles. *Arch Oral Biol.* 2016; 67:46-53.
36. De Lima R, Seabra AB, Duran N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *J Appl Toxicol.* 2012; 32(11): 867-79.

37. Echt A, Hirst DVL, Kovein R, The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). Control technology for dowell drilling in concrete. Springfield, MO; 2011. [EPHB Report nº 347-14a] [acesso em 2017 01 17]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/niosh/surveyreports/pdfs/347-15a.pdf>.
38. Ehrlich HP, Moyer KE. Cell-populated collagen lattice contraction model for the investigation of fibroblast collagen interactions. *Methods Mol Biol.* 2013; 1037: 45-58.
39. Fabbro MT, Foggi CC, Santos LP, Gracia L, Perrin A, Perrin C, et al. Synthesis, antifungal evaluation and optical properties of silver molybdate microcrystals in different solvents: a combined experimental and theoretical study. *Dalton Trans.* 2016; 45(26):10736-43.
40. Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res.* 2010; 89(1):8-18.
41. Foggi CC, Fabbro MT, Santos LP, de Santana YV, Vergani CE, Machado AL, et al. Synthesis and evaluation of α -Ag₂WO₄ as novel antifungal agent. *Chem Phys Let.* 2017; 674: 125–9.
42. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2011; 20(4): 251-60.
43. Germain L, Jean A, Auger FA, Garrel DR. Human wound healing fibroblasts have greater contractile properties than dermal fibroblasts. *J Surg Res.* 1994; 57(2): 268-73.
44. Gouveia AF, Sczancoski JC, Ferrer MM, Lima AS, Santos MR, Li MS et al. Experimental and theoretical investigations of electronic structure and photoluminescence properties of beta-Ag₂MoO₄ microcrystals. *Inorg Chem.* 2014; 53(11): 5589-99.
45. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis.* 2003; 37(9): 1172-7.
46. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infection. *Cell Microbiol.* 2009; 11(7): 1034-43.
47. Harges J, Ahrens H, Gebert C, Streitbuerger A, Buerger H, Erren M, et al. Lack of toxicological side-effects in silver-coated megaprotheses in humans. *Biomaterials.* 2007; 28(18): 2869-75.
48. He D, Bligh MW, Waite TD. Effects of aggregate structure on the dissolution kinetics of citrate-stabilized silver nanoparticles. *Environ Sci Technol.* 2013; 47(16): 9148–56.

49. Helary C, Ovtracht L, Coulomb B, Godeau G, Giraud-Guille MM. Dense fibrillar collagen matrices: a model to study myofibroblast behaviour during wound healing. *Biomaterials*. 2006; 27(25):4443-52.
50. Herzog F, Clift MJ, Piccapietra F, Behra R, Schmid O, Petri-Fink A, et al. Exposure of silver-nanoparticles and silver-ions to lung cells in vitro at the air-liquid interface. *Part Fibre Toxicol*. 2013;10:11.
51. Hojo K, Nagaoka S, Oshima T, Maeda N, Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res*.2009; 88 (11): 982-90.
52. Holmstrup P, Poulsen AH, Andersen L, Skuldbol T, Fiehn NE. Oral infections and systemic diseases. *Dent Clin North Am*. 2003; 47(3): 575-98.
53. Horie M, Kato H, Fujita K, Endoh S, Iwahashi H. In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. *Chem Res Toxicol*. 2012; 25(3):605-19.
54. Howard SJ, Catchpole M, Watson J, Davies SC. Antibiotic resistance: global response needed. *Lancet Infect Dis*. 2013; 13(12):1001-3.
55. Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence*. 2011; 2(5): 435–44.
56. Hwang IS, Lee J, Hwang JH, Kim KJ, Lee DG. Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. *FEBS J*. 2012; 279(7): 1327-38.
57. Iñigo M, Pemán J, Del Pozo JL. Antifungal activity against *Candida* biofilms. *Int J Artif Organs*. 2012; 35(10): 780-91.
58. Jiang W, Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotech*. 2008; 3: 145 – 50.
59. Kaba S, Egorova E. In vitro studies of the toxic effects of silver nanoparticles on HeLa and U937 cells. *Nanotechnol Sci Appl*. 2015; 5(8):19-29.
60. Kawata K, Osawa M, Okabe S. In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ Sci Technol*. 2009; 43(15): 6046-51.
61. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Parque SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007; 3(1):95-101.
62. Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, Kim JM, Park JD, et al. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol*. 2008; 20(6): 575– 83.

63. Kim YS, Song MY, Park JD, Song KS, Ryu HR, Chung YH, et al. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* 2010; 7(20): 1-11.
64. Kim S, Choi JE, Choi J, Chung K, Park K, Yi J, et al. Oxidative stress dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol in Vitro.* 2009; 23(6): 1076-84.
65. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(7): 471-80.
66. Krajewski S, Pucek R, Panacek A, Avci-Adali M, Nolte A, Straub A, et al. Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified Chandler-loop in vitro assay on human blood. *Acta Biomater.* 2013; 9(7): 7460-8.
67. Krom BP, Kidwai S, Ten Cate JM. *Candida* and other fungal species: forgotten players of healthy oral microbiota. *J Dent Res.* 2014; 93(5):445–51.
68. Kruk T, Szczepanowicz K, Kregiel D, Szyk-Warszynska L, Warszynski P. Nanostructured multilayer polyelectrolyte films with silver nanoparticles as antibacterial coatings. *Coll Surf B: Biointer.* 2016, 137: 158–66.
69. Larson EM, Doughman DJ, Gregerson DS, Obritsch WF. A new, simple, nonradioactive, nontoxic in vitro assay to monitor corneal endothelial cell viability. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38(10): 1929-33.
70. Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11(6): 371–84.
71. Li L, Sun J, Li X, Zhang Y, Wang Z, Wang C, et al. Controllable synthesis of monodispersed silver nanoparticles as standards for quantitative assessment of their cytotoxicity. *Biomaterials.* 2012; 33(6): 1714-21.
72. Liu J, Sonshine DA, Shervani S, Hurt RH. Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. *ACS Nano.* 2010; 4(11): 6903-13.
73. Liu Z, Wang Y, Zu Y, Fu Y, Li N, Guo N, et al. Synthesis of polyethylenimine (PEI) functionalized silver nanoparticles by a hydrothermal method and their antibacterial activity study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014; 42:31-7.
74. Longo VM, De Foggi CC, Ferrer MM, Gouveia AF, Andre RS, Avansi W, et al. Potentiated electron transference in alpha-Ag₂WO₄ microcrystals with Ag nanofilaments as microbial agent. *J Phys Chem A.* 2014; 118(31): 5769-78.
75. Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1994; 171(1) 131-7.

76. Maillard JY, Hartemann P. Silver as an antimicrobial: facts and gaps in knowledge. *Crit Rev Microbiol*. 2012; 39(4): 373–83.
77. Mateasik A, Trnka M, Kajo K, Vallova M, Cunderlikova B, et al. Cell-type dependent response to photodynamic treatment in 3D collagen cell cultures. *J Photochem Photobiol B: Biol*. 2017; 166: 94-103.
78. Mendy A, Gasana J, Vieira ER. Urinary heavy metals and associated US adult population. *Int J Environ Health Res*. 2012; 22(2): 105-18.
79. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, de Camargo ER, Filho AC, Barbosa DB. Silver distribution and release from an antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles. *J Prosthodont*. 2012; 21(1): 7–15.
80. Monteiro DR, Silva S, Negri M, Gorup LF, de Camargo ER, Oliveira R, et al. Silver colloidal nanoparticles: effect on matrix composition and structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *J Appl Microbiol*. 2013; 114(4): 1175–83.
81. Moulin V, Castilloux G, Jean A, Garrel DR, Auger FA, Germain L. In vitro models to study wound healing fibroblasts. *Burns*. 1996; 22(5): 359-62.
82. Muadcheingka T, Tantivitayakul P. Distribution of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. *Arch Oral Biol*. 2015; 60(6): 894 – 901.
83. Mukherjee PK, Chandra J. *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Updat*. 2004; 7 (4-5): 301-9.
84. Murray CB, Kagan CR, Bawendi MG. Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies. *Annu Rev Mater Sci*. 2000; 30: 545-610.
85. Muzyka, BC, Epifanio RN. Update on oral fungal infections. *Dent Clin North Am*. 2013; 57(4): 561-81.
86. Nathan K. Archer, Mark J. Mazaitis, J. William Costerton, Jeff G. Leid, et al. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human diseases. *Virulence*. 2011; 2(5): 445-59.
87. Nett J. Future directions for anti-biofilm therapeutics targeting *Candida*. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014; 12(3): 375-82.
88. Nolte SV, Xu W, Rennekampff HO, Rodemann HP. Diversity of fibroblasts--a review on implications for skin tissue engineering. *Cells Tissues Organs*. 2008; 187(3): 165-76.

89. Nygaard UH, Niehues H, Rikken G, Rodijk-Olthuis D, Schalkwijk J, van den Bogaard EH. Antibiotics in cell culture: friend or foe? Suppression of keratinocyte growth and differentiation in monolayer cultures and 3D skin models. *Exp Dermatol*. 2015; 24(12): 964–5.
90. Overbye KM, Barrett F. Antibiotics: where did we go wrong? *Drug Discov Today*. 2005; 10(1):45-52.
91. Panacek A, Kvittek L, Pucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N, et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J phys Chem B*. 2006; 110(33): 16248-53.
92. Parekh A, Sandulache VC, Singh T, Cetin S, Sacks MS, Dohar JE, et al. Prostaglandin E2 differentially regulates contraction and structural reorganization of anchored collagen gels by human adult and fetal dermal fibroblasts. *Wound Repair Regen*. 2009; 17(1): 88-98.
93. Parks AC, Sung K, Wu B. A three-dimensional in vitro model to quantify inflammatory response to biomaterials. *Acta Biomaterialia*. 2014; 10(11): 4742–9.
94. Paul EH, Sun B, Kainth KS, Kromah F. Elucidating the mechanism of wound contraction: rapid versus sustained myosin ATPase activity in attached-delayed-released compared with free-floating fibroblast-populated collagen lattices. *Wound Repair Regen*. 2006; 14(5): 625-32.
95. Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabil*. 2002; 29(11): 1115-9.
96. Qin H, Cao H, Zhao Y, Zhu C, Cheng T, Wang Q, et al. In vitro and in vivo anti-biofilm effects of silver nanoparticles immobilized on titanium. *Biomaterials*. 2014; 35(33): 9114-25.
97. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 98(1): 53-9.
98. Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota. *J Periodontol*. 2014; 85(1): 160-9.
99. Roca RA, Sczancoski JC, Nogueira IC, Fabbro MT, Alves HC, Gracia L, et al. Facet dependent photocatalytic and antibacterial properties of α -Ag₂WO₄ crystals: combining experimental data and theoretical insights. *Catal Sci Technol*. 2015; 5(8): 4091–107.
100. Rossolini GM, Arena F, Pecile P, Pollini S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr Opin Pharmacol*. 2014; 18: 56–60.

101. Salvatori O, Puri S, Tati S, Edgerton M. Innate immunity and saliva in *Candida albicans*-mediated oral diseases. *J Dent Res*. 2016; 95(4): 365-71.
102. Schmitt-Graff A, Desmouliere A, Gabbiani G. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch*. 1994; 425(1):3-24.
103. Sefra NR. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)*. 2012; 12(9): 12347–60.
104. Sharma HS, Sharma A. Neurotoxicity of engineered nanoparticles from metals. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2012; 11(1): 65-80.
105. Shi B, Wu T, McLean J, Edlund A, Young Y, He X, et al. The denture-associated oral microbiome in health and stomatitis. *mSphere*. 2016; 1(6): e00215-16.
106. Shingadia D, Novelli V. Diagnosis and treatment of tuberculosis in children. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3(10): 624-32. Erratum in *Lancet Infect Dis*. 2004; 4(4):251. Dosage error in article text.
107. Shulman JD, Rivera-Hidalgo F, Beach MM. Risk factors associated with denture stomatitis in the United States. *J Oral Pathol Med*. 2005; 34(6):340-6.
108. Siddiqui MA, Saquib Q, Ahamed M, Farshori NN, Ahmad J, Wahab R, et al. Molybdenum nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress, G2/M arrest and DNA damage in mouse skin fibroblast cells (L929). *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015; 125:73-81.
109. Sies H. Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutat Res*. 1993; 299(3-4): 183-91.
110. Silva S, Pires P, Monteiro DR, Negri M, Gorup LF, Camargo ER, et al. The effect of silver nanoparticles and nystatin on mixed biofilms of *Candida glabrata* and *Candida albicans* on acrylic. *Med Mycol*. 2013; 51(2): 178–84.
111. Singh R, Shedbalkar UU, Wadhvani SA, Balu, Chopade BA. Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015; 99(11): 4579–93.
112. Sintubin L, De Gusseme B, Van der Meeren P, Pycke BF, Verstraete W, Boon N. The antibacterial activity of biogenic silver and its mode of action. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011; 91(1): 153-62.

113. Soares GM, Figueiredo LC, Faveri M, Cortelli SC, Duarte PM, Feres M. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *J Appl Oral Sci.* 2012; 20(3): 295–304.
114. Spacciapoli P, Buxton D, Rothstein D, Friden P. Antimicrobial activity of silver nitrate against periodontal pathogens. *J Periodontal Res* 2001; 36(2): 108-13.
115. Stensberg MC, Wei Q, Mclamore ES, Porterfield DM, Wei A, Sepulveda MS. Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging. *Nanomedicine (Lond).* 2011; 6(5): 879–98.
116. Stone V, Johnston H, Clift MJ. Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions. *IEEE Trans NanoBioscience.* 2007; 6(4): 331–40.
117. Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science.* 1988; 240(4849): 177-84.
118. Suzuki T, Fujikura K, Higashiyama T, Takata K. DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *J Histochem Cytochem.* 1997; 45(1):49-53.
119. Tamariz E, Grinnell F. Modulation of fibroblast morphology and adhesion during collagen matrix remodeling. *Mol Biol Cell.* 2002; 13: 3915–29.
120. Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Presterl E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses.* 2012; 55(3):199-204.
121. Torres SR, Peixoto CB, Caldas DM, Silva EB, Magalhães FAC, Uzeda M, et al. Clinical aspects of *Candida* species carriage in saliva of xerostomic subjects. *Med Mycol.* 2003; 41:411-5.
122. Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog Dis.* 2016; 74(4): ftw018.
123. Tuson HH, Weibel DB. Bacteria–surface interactions. *Soft Matter.* 2013; 9(18): 4368–80.
124. Vande Berg JS, Rudolph R, Poolman WL, Disharoon DR. Comparative growth dynamics and actin concentration between cultured human myofibroblasts from granulating wounds and dermal fibroblasts from normal skin. *Lab Invest.* 1989; 61(5): 532-8

125. Vanden AA, de Meel H, Ahariz M, Perraudin JP, Beyer I, Courtois P. Denture contamination by yeasts in the elderly. *Gerodontology*. 2008; 25:222–8.
126. Vazquez-Munoz R, Avalos-Borja M, Castro-Longoria E. Ultrastructural analysis of *Candida albicans* when exposed to silver nanoparticles. *PloS One*. 2014; 9(10): e108876.
127. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis part 1: causes and threats. *PT*. 2015; 40(4): 277–83.
128. Vyskocil A, Viau C. Assessment of molybdenum toxicity in humans. *J Appl Toxicol*. 1999; 19(3): 185-92.
129. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 3. Treatment of oral candidosis. *Aust Dent J*. 1998; 43:244–9.
130. Wei L, Lu J, Xu H, Patel A, Chen Z, Chen G. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Dis Tod*. 2015; 20(5): 595-601.
131. Wong SY, Moskowitz JS, Veselinovic J, Rosario AR, Timachova K, Blaisse MR, et al. Dual functional Polyelectrolyte multilayer coatings for implants: permanent microbicidal base with controlled release of therapeutic agents. *J Am Chem Soc*. 2010; 132(50): 17840–8.
132. Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, et al. Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol*. 2013; 28(2): 83-101.
133. Zhang T, Wang L, Chen Q, Chen C. Cytotoxic potential of silver nanoparticles. *Yonsei Med J*. 2014; 55(2): 283-91.
134. Zhao L, Chu PK, Zhang Y, Wu Z. Antibacterial coatings on titanium implants. *J Biomed Mater Res B, Appl Biomater*. 2009; 91(1): 470-80.
135. Zissis A, Yannikakis S, Harrison A. Comparison of denture stomatitis prevalence in 2 population groups. *Int J Prosthodont*. 2006; 19(6): 621–5.

Não autorizo a reprodução deste trabalho, até 12 de maio de 2019.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 12 de maio de 2017.

NATALI LISETTE HARO CHÁVEZ