

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 10/02/2024



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



Bruna Natália Alves da Silva Pimentel

**Microcristais de tungstato de prata, molibdato de prata e vanadato de prata:
biocompatibilidade e atividade antifúngica sobre biofilme de *Candida albicans***

Araraquara

2022



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



Bruna Natália Alves da Silva Pimentel

**Microcristais de tungstato de prata, molibdato de prata e vanadato de prata:
biocompatibilidade e atividade antifúngica sobre biofilme de *Candida albicans***

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutora em Reabilitação Oral, na Área de Prótese

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

Coorientadora: Dr^a. Paula Aboud Barbugli

Araraquara

2022

P644m Pimentel, Bruna Natália Alves da Silva
Microcristais de tungstato de prata, molibdato de prata e vanadato de prata :
biocompatibilidade e atividade antifúngica sobre biofilme de Candida albicans /
Bruna Natália Alves da Silva Pimentel. -- Araraquara, 2022
115 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de
Odontologia, Araraquara
Orientador: Carlos Eduardo Vergani
Coorientadora: Paula Aboud Barbugli

1. Teste de materiais. 2. Candida albicans. 3. Prata. 4. Citocinas. 5.
Metaloproteinases de matriz. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia,
Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Bruna Natália Alves da Silva Pimentel

**Microcristais de tungstato de prata, molibdato de prata e vanadato de prata:
biocompatibilidade e atividade antifúngica sobre biofilme de *Candida albicans***

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutora em Reabilitação Oral

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

2º Examinador: Profª. Drª. Karin Hermana Neppelenbroek

3º Examinador: Profª. Drª. Débora de Barros Barbosa

4º Examinador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

Araraquara, 10 de fevereiro de 2022

DADOS CURRICULARES

Bruna Natália Alves da Silva Pimentel

NASCIMENTO: 06 de novembro de 1990, em São Paulo, São Paulo, Brasil

FILIAÇÃO: Maria do Carmo Alves da Silva

Antonio Luiz Pimentel

2009 a 2014 Curso de Graduação pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia – UFBA

2011 a 2011 Extensão Universitária em Odontologia Hospitalar no Hospital Ana Nery (HAN) pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia - UFBA

2011 a 2012 Extensão Universitária em Monitoria Voluntária nas Disciplinas de Patologia Geral e Estomatologia II da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia – UFBA

2012 a 2014 Extensão Universitária em Grupo de Pesquisa em Imaginologia Dentomaxilofacial (CEPOV) pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia – UFBA

2013 a 2014 Extensão Universitária em Monitoria Voluntária na Disciplina de Prótese Parcial Fixa II pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia – UFBA

2015 a 2017 Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – Unesp

2015 a 2016 Estágio docência na Disciplina de Prótese Parcial Removível I e II do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” - Unesp

2017 a 2022 Curso de Pós-graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível Doutorado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” - Unesp

2018 a 2019 Estágio docência nas Disciplinas de Prótese Parcial Removível II e Prótese Total I do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” - Unesp

2019 a 2019 Participação no Programa de Aperfeiçoamento e Apoio à Distância no Ensino Superior (PAADES), ministrando aula na Disciplina de Prótese Parcial Removível I do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” - Unesp

Dedico este trabalho ao meu filho, Bernardo, que trouxe mais luz e sentido para minha vida, e me fez enxergar o mundo a partir de um novo prisma.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por todas as bênçãos entregues durante esse período do doutorado, mas principalmente por ter protegido a mim e àqueles que me rodeiam nesses tempos tão sombrios e incertos. À Ele toda honra, toda glória e todo o louvor!

Aos meus pais, **Antônio Luiz Pimentel** e **Maria do Carmo Alves da Silva**, por todo o apoio, amor e carinho. Muito obrigada por me incentivar, me ouvir, me acalmar, me acalentar. Essa trajetória teria sido muito mais difícil sem o apoio de vocês.

Ao meu irmão, **Luiz Felipe**, por ser meu parceiro e se fazer presente na minha vida mesmo estando longe.

À minha irmã, **Júlia**, minha princesinha, aquela que me ensina a ser mais paciente, mais amorosa, mais leve, enfim, uma pessoa melhor a cada dia.

Ao meu marido, **Hugo Lira**. Não tenho palavras para agradecer tudo o que você fez, e tem feito por mim. Obrigada por tornar os meus sonhos seus, embarcar nas minhas loucuras junto comigo e me fazer a pessoa mais feliz desse mundo. Com certeza eu não teria chegado até aqui se não fosse por todo o seu apoio, carinho, amor e atenção.

Ao meu filho, **Bernardo**, por me fazer entender o real sentido da vida e me tornar uma pessoa cada dia melhor. Você foi a maior alegria deste último ano!

Às minhas amigas, **Luana Dias** e **Amanda Brandão**. Vocês foram o maior presente que a Pós-Graduação me deu! Obrigada por todo apoio, pelas conversas na madrugada, pela companhia no laboratório, pelas risadas, pela vida compartilhada. Tenho certeza de que ainda viveremos muitos outros momentos maravilhosos juntas.

Às minhas amigas de Salvador, **Marina**, **Deise** e **Bruna**. Obrigada por me apoiarem e incentivarem sempre.

Aos professores, **Luciano Castellucci** e **Viviane Sarmento**, que ainda na graduação me inspiraram e me incentivaram a seguir carreira acadêmica.

Aos professores da Prótese Parcial Removível, **Profª. Drª. Paula Volpato Sanitá**, **Profª. Drª. Janaína Habib Jorge**, **Profª. Drª. Ana Cláudia Pavarina** e **Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima**, bem como à **Profª. Drª. Marlise Inêz Klein**, pela ótima convivência e grandes ensinamentos. Tenham a certeza de que aprendi muito com cada um de vocês!

À **Profª. Drª. Livia Dovigo Nordi**, por me apresentar ao lindo mundo da estatística de forma simples e com muito amor. Obrigada por todo ensinamento e toda ajuda.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani**, por toda a confiança, incentivo, oportunidade e aprendizado. Esses anos como sua orientanda foram muito enriquecedores para minha vida tanto profissional como pessoal.

À minha co-orientadora, **Drª. Paula Aboud Barbugli**, por todo ensinamento e convivência nesses últimos anos. Você, com certeza, contribui muito para minha formação.

Aos professores que aceitaram o convite para compor minhas bancas de pré-qualificação e de qualificação, **Profª. Drª. Janaína Habib Jorge**, **Profª. Drª. Ana Carolina Pero** e **Profª. Drª. Ana Cláudia Pavarina**, pelas contribuições feitas que ajudaram a enriquecer esse trabalho.

Aos professores que aceitaram o convite para compor a banca de defesa desta tese do doutorado, **Profª. Drª. Karin Hermana Neppelenbroek**, **Profª. Drª. Débora de Barros Barbosa** e **Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima**, pela disponibilidade em contribuir para melhorar esse trabalho.

Aos funcionários da portaria, em especial à **Ricardo Pereira** e **Bruno Mazzoni**, por todo cuidado, carinho, conversa, atenção e amizade.

Às bibliotecárias da FOAr - Unesp, por todo suporte e prontidão sempre que precisei buscar auxílio.

À **FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (Processo nº. 2018/01677-8; Processo nº. 2013/07296-2) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para minha formação, muito obrigada!

“Tudo posso naquele que me fortalece.”
Filipenses 4:13*

* Bíblia Sagrada. Filipenses 4:13. Edição revista e corrigida por João Ferreira de Almeida. São Paulo: Geográfica; 2015.

Pimentel BNAS. Microcristais de tungstato de prata, molibdato de prata e vanadato de prata: biocompatibilidade e atividade antifúngica sobre biofilme de *Candida albicans* [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

A presente tese foi dividida em dois estudos que tiveram como objetivos (1) avaliar a citotoxicidade dos microcristais vanadato de prata (α -AgVO₃; 3,9 μ g/mL e 15,62 μ g/mL), tungstato de prata (α -Ag₂WO₄; 7,81 μ g/mL) e molibdato de prata (β -Ag₂MoO₄; 15,62 μ g/mL) sobre células inflamatórias THP-1 e macrófago em monocamada, bem como quantificar a produção de superóxido, citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases de matriz (MMP); (2) avaliar a atividade antifúngica de α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄, sobre biofilme de *Candida albicans* cultivados sobre modelos de co-cultivo tridimensional (3D). A citotoxicidade e a resposta inflamatória de α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄ foram avaliadas sobre os modelos de co-cultivo 3D. No estudo 1, a viabilidade celular de THP-1 e macrófagos, após 24 horas de contato com α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄, foi determinada a partir do ensaio de alamarBlue™. A produção da espécie reativa de oxigênio (superóxido) foi quantificada por fluorimetria e visualizada por microscopia de fluorescência confocal. Já a produção de citocinas e metaloproteinases de matriz foi quantificada por citometria de fluxo e ELISA, respectivamente. Os microcristais α -Ag₂WO₄, β -Ag₂MoO₄ e α -AgVO₃, na concentração fungicida mínima (CFM: 15,62 μ g/mL), promoveram pequena diminuição na viabilidade de THP-1 (77,3%, 69,29% e 73,96%, respectivamente). Já em macrófagos, apenas α -AgVO₃ (CFM) foi capaz de diminuir a viabilidade celular (70,36%). Em ambas as células foram observadas produção de superóxido. Com relação às citocinas, houve aumento na produção de IL-8 por ambas as células, bem como aumento na produção de IL-1 β por macrófagos. A MMP-8 não foi detectada no sobrenadante de THP-1 em nenhuma condição avaliada, enquanto a MMP-9 teve sua produção reduzida nas células THP-1 expostas a α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄. Já os sobrenadantes dos macrófagos apresentaram diminuição de MMP-8 e -9, independente do microcristal ao qual a célula foi exposta. No estudo 2, um modelo de co-cultivo 3D envolvendo três linhagens celulares foi desenvolvido e validado. Nestes modelos foi determinada a citotoxicidade, pelo ensaio colorimétrico MTT, de α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄, nas mesmas concentrações testadas no estudo 1. Foi avaliada também a ação dos microcristais sobre biofilmes de *Candida albicans* crescidos sobre os modelos 3D, simulando um processo infeccioso. Além disso, a modulação da resposta inflamatória foi verificada a partir da dosagem de citocinas pró-inflamatórias, na ausência e na presença dos microcristais, tanto nos modelos com infecção, quanto nos modelos sem infecção. O modelo de co-cultivo 3D se mostrou adequado para avaliar a biocompatibilidade de biomateriais bem como processos infecciosos. Entre os microcristais avaliados, apenas α -AgVO₃ mostrou-se citotóxico, além de não ter sido efetivo contra o biofilme de *C. albicans* e não ter modulado a resposta inflamatória; α -Ag₂WO₄ apresentou atividade contra biofilme de *C. albicans*, com redução de 1,5 log₁₀, semelhante à redução observada no controle com a droga padrão (fluconazol), e induziu a produção de IL-6, IL-8 e IL-1 β ; β -Ag₂MoO₄ não apresentou atividade contra o biofilme de *C. albicans*, apesar de ter sido biocompatível e capaz de diminuir a produção de TNF α nos modelos infectados. Com base nos resultados destes estudos, α -Ag₂WO₄ foi considerado um material promissor no tratamento de infecções por *C. albicans*.

Palavras chave: Teste de materiais. Candida albicans. Prata. Citocinas. Metaloproteinases da matriz.

Pimentel BNAS. Silver tungstate, silver molybdate and silver vanadate microcrystals: biocompatibility and antifungal activity on *Candida albicans* biofilm [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

This present thesis was divided into two studies that aimed to (1) evaluate the cytotoxicity of microcrystals silver vanadate (α -AgVO₃; 3.9 μ g/mL and 15.62 μ g/mL), silver tungstate (α -Ag₂WO₄; 7.81 μ g/mL) and silver molybdate (β -Ag₂MoO₄; 15.62 μ g/mL) on THP-1 and macrophage inflammatory cells in monolayer model, as well as quantifying the production of superoxide, proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases (MMP); (2) evaluate the antifungal activity of α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ and β -Ag₂MoO₄ on *Candida albicans* biofilm cultivated on three-dimensional (3D) co-culture models. The cytotoxicity and inflammatory response of α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ and β -Ag₂MoO₄ were also evaluated on 3D co-culture models. In study 1, the cell viability of THP-1 and macrophages, after being challenged with α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ and β -Ag₂MoO₄ for 24 hours, was determined using the alamarBlue™ assay. The production of reactive oxygen species (superoxide) was quantified by fluorimetry and visualized by confocal laser scanning microscopy. The production of cytokines and matrix metalloproteinases was quantified by flow cytometry and ELISA, respectively. The α -Ag₂WO₄, β -Ag₂MoO₄ and α -AgVO₃ microcrystals, at the minimum fungicidal concentration (MFC: 15.62 μ g/mL), promoted a small decrease in THP-1 viability (77.3%, 69.29% and 73.96%, respectively). In macrophages, only α -AgVO₃ (MFC) was able to decrease cell viability (70.36%). In both cells, superoxide production was observed. Regarding cytokines, there was an increase in IL-8 production by both cells, as well as an increase in IL-1 β production by macrophages. MMP-8 was not detected in the THP-1 supernatant in any condition evaluated, whereas MMP-9 had its production reduced in THP-1 cells exposed to α -Ag₂WO₄ and β -Ag₂MoO₄. Macrophage supernatants showed a decrease in MMP-8 and -9, regardless of the microcrystals to which cells were exposed. In study 2, a 3D co-culture model involving three cell lines was developed and validated. In these models, the cytotoxicity of α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ and β -Ag₂MoO₄ was determined by MTT colorimetric assay, at the same concentrations tested in study 1. The antimicrobial activity of microcrystals on *C. albicans* biofilms grown on 3D models was also evaluated, simulating an infectious process. Furthermore, the modulation of the inflammatory response was assessed by measuring the production of pro-inflammatory cytokines, in the absence and presence of microcrystals, in both infected and noninfected models. The 3D co-culture model proved to be adequate to assess the biocompatibility of biomaterials as well as the infectious processes. Among the microcrystals evaluated, α -AgVO₃ was cytotoxic, had no effect against *C. albicans* biofilm and did not modulate the inflammatory response; α -Ag₂WO₄ showed activity against *C. albicans* biofilm with a 1.5 log₁₀ reduction, similar to the control with the standard drug (fluconazole). α -Ag₂WO₄ also induced the production of IL-6, IL-8 and IL-1 β ; β -Ag₂MoO₄ showed no activity against *C. albicans* biofilm, despite being biocompatible and able to reduce the production of TNF α in infected models. Based on the findings of these studies, α -Ag₂WO₄ appears to be a promising material in the treatment of *C. albicans* infections

Keywords: Materials testing. *Candida albicans*. Silver. Cytokines. Matrix metalloproteinases.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 PROPOSIÇÃO.....	21
2.1 Objetivos Específicos	21
3 PUBLICAÇÕES	22
3.1 Publicação 1	22
3.2 Publicação 2	55
4 DISCUSSÃO	87
5 CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS	93
APÊNDICE A.....	99
ANEXO A.....	114

1 INTRODUÇÃO

A microbiota oral é composta por bactérias e fungos que vivem em comunidade e interagem entre si de maneira sinérgica, mutualística ou antagônica¹. Essa microbiota oral pode ser afetada por diversos fatores, como temperatura, pH, oscilações nos níveis de nutrientes e exposição a fatores químicos, como medicamentos, cremes dentais, enxaguatórios bucais, entre outros, sendo um ambiente desafiador para os microrganismos que nele residem¹. Entre os microrganismos encontrados na cavidade oral àqueles pertencentes à *Candida spp.* estão presentes em aproximadamente 70% da população saudável, sendo *Candida albicans*, um fungo comensal oportunista, a espécie de *Candida* mais abundante². Fatores que causem o desequilíbrio entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e os fatores virulência de *C. albicans* podem resultar em colonização de sítios na cavidade oral, ocasionando lesões como a candidose oral¹⁻⁴.

A patogenicidade de *C. albicans* é influenciada por diversos fatores de virulência, como a sua capacidade de mudar de forma (polimorfismo), a capacidade de adesão aos tecidos, a secreção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e hemolisinas), além de sua habilidade de formar biofilmes⁵. *C. albicans* pode ser encontrada nas formas de levedura, pseudo-hifa ou hifa (filamentar). Quando na forma filamentar, *C. albicans* é responsável pela invasão tecidual^{4,6,7}, causando infecções profundas, sendo o formato de levedura importante na disseminação inicial e processos infecciosos^{4,7}. O polimorfismo de *C. albicans* interfere no seu reconhecimento pelas células do sistema imunológico do hospedeiro, uma vez que a expressão de padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs) varia de acordo com a morfologia de *C. albicans*². Autores demonstraram que a transição de levedura para hifa promove o escape de *C. albicans* de macrófagos e neutrófilos e, apesar das células dendríticas serem capazes de fagocitar ambos os tipos morfológicos deste fungo, isto ocorre por diferentes receptores e estimula diferentes respostas inflamatórias no hospedeiro⁷. Essa habilidade de *C. albicans* em mudar de forma é regulada por cascatas sinalizadoras que são controladas por diferentes estímulos do meio⁷, como disponibilidade de nutrientes, pH, hipóxia e diferentes níveis de CO₂⁸.

A capacidade de *C. albicans* em aderir às superfícies do hospedeiro é um importante fator na colonização dos tecidos. Esta adesão é mediada por adesinas

fúngicas, como por exemplo as proteínas Als (sequência semelhante a aglutinina - *agglutinin-like sequence*), que interagem com diferentes receptores do hospedeiro, auxiliando na adesão da célula fúngica. Após a adesão, enzimas hidrolíticas, como proteases e fosfolipases, auxiliam *C. albicans* no processo de penetração e invasão nas células do hospedeiro, com consequente destruição tecidual². O aumento na síntese e na atividade dessas enzimas hidrolíticas favorece a patogenicidade do fungo, causando sinais clínicos de candidíase severa⁵. Outro fator relacionado à patogenicidade de *C. albicans* é sua capacidade de formar biofilmes sobre as superfícies em que se adere⁵⁻⁷. Biofilmes são comunidades de microrganismos altamente organizadas, aderidas às superfícies bióticas ou abióticas, envoltas por uma matriz extracelular própria (MEC)^{5,9,10}. Clinicamente, biofilmes representam fontes de tolerância frente aos antimicrobianos. Os mecanismos de tolerância aos fármacos ainda não estão totalmente esclarecidos, contudo acredita-se que a penetração destes fármacos no biofilme seria prejudicada pela presença da MEC, de forma que apenas os microrganismos da camada superficial seriam atingidos pelo tratamento⁵.

A terapia antifúngica atual inclui o uso, local ou sistêmico, de fármacos como azóis, polienos e equinocandinas¹¹. De forma geral, estes fármacos atuam impedindo a síntese da membrana celular fúngica, interferindo na replicação das células filhas, e também na ligação ao ergosterol da membrana celular, causando ruptura da célula fúngica^{11,12}. Apesar de apresentarem boa performance, o uso prolongado de antifúngicos sistêmicos convencionais pode acarretar danos hepáticos e renais¹¹. É importante pontuar que o uso prolongado e indiscriminado desta classe de fármacos é um dos principais fatores no aumento da resistência fúngica, e pode resultar em alterações, como o aumento na bomba de efluxo, alterações fenotípicas no alvo do fármaco e recombinações genéticas, que minimizam o efeito do tratamento, resultando no surgimento seletivo de células fúngicas resistentes¹². Por conta disto, terapias que inativem os microrganismos de maneira química e/ou física e que possuam baixa propensão em causar resistência e toxicidade sistêmica têm sido amplamente pesquisadas¹³⁻²².

O Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais (CDMF), um Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão (CEPID) apoiado pela FAPESP, vem estudando alternativas para inativação de microrganismos através do emprego de microcristais contendo prata (tungstato de prata – α -Ag₂WO₄^{18,21,22}, molibdato de prata – β -Ag₂MoO₄¹⁹, vanadato de prata – α -AgVO₃²⁰). Estes materiais têm sido idealizados

tanto para revestimento como para incorporação em materiais de uso médico-odontológico, como superfícies de titânio e de resinas acrílicas. Estudos prévios^{19,22-25} demonstraram que, em culturas planctônicas de *C. albicans* (ATCC 90028), os microcristais α -Ag₂WO₄, β -Ag₂MoO₄ e α -AgVO₃ foram capazes de inibir o crescimento deste fungo. O mecanismo de ação químico-teórico destes microcristais se dá a partir da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), como os radicais hidroxila (OH^{*}), superóxido (O₂⁻) e hidroperoxila (\bullet O₂H^{*})¹⁸⁻²². Com o emprego de técnicas analíticas de fotoluminescência, foi possível constatar que α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄ emitem espectros de luz visível nas regiões do azul e do vermelho. Estas regiões estão relacionadas com defeitos energéticos gerados nos microcristais e estes defeitos são responsáveis por promover distorções nas moléculas de água, induzindo a formação de OH^{*} e \bullet O₂H^{*}^{19-22,25}. As espécies reativas geradas seriam, portanto, responsáveis pela morte dos microrganismos, através de danos causados por estresse oxidativo em moléculas, como polissacarídeos, ergosterol, lipídeos e proteínas de membrana^{19-22,25}. No entanto, apesar dos resultados promissores obtidos em culturas planctônicas, até o momento não havia dados concretos a respeito da ação destes microcristais sobre biofilmes.

Além da capacidade antimicrobiana, a biocompatibilidade dos microcristais em questão também é um parâmetro importante a ser avaliado. A produção de EROs, principal mecanismo de ação destes microcristais, além de causar a morte dos microrganismos, também pode comprometer as células do hospedeiro. Essas moléculas atuam no corpo humano regulando processos biológicos e fisiológicos, como a proliferação celular e a resposta imunológica²⁶. Entretanto, altos níveis de EROs podem causar hiperativação da resposta inflamatória, aumentando os níveis de citocinas pró-inflamatórias e causando danos teciduais²⁶. Estudos prévios realizados em células em monocamada (2D) demonstram ausência de citotoxicidade em queratinócitos orais (linhagem NOK-si) e fibroblastos gengivais (linhagem FGH), após 24 horas de exposição a α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄^{23-25,27}. Também foi demonstrado que α -Ag₂WO₄ e α -AgVO₃ não foram capazes de degradar o DNA das células^{23,24}. Apesar desses resultados contribuírem com informações relevantes, existem limitações na extrapolação dos dados, uma vez que estudos envolvendo células em monocamada são limitados em relação à reprodução do ambiente complexo e dinâmico dos tecidos²⁸. Estas limitações podem conduzir a resultados falsos ou inconsistentes, uma vez que a arquitetura tecidual específica, sinais

mecânicos e bioquímicos, além da comunicação célula-célula, estão ausentes em culturas em monocamada²⁹.

Com relação à aplicabilidade desses microcristais, o intuito é, futuramente, realizar revestimento de componentes de titânio, como parafusos e *abutments*, bem como incorporar esses compostos em materiais de uso rotineiro na clínica odontológica, como resinas acrílicas, resinas compostas, cimentos resinosos, entre outros. Dessa forma, a partir da ação antimicrobiana desses microcristais, seria possível obter um melhor controle de patologias frequentes, como estomatite protética, cárie, periodontite e periimplantite. Logo, o foco principal no estudo destes microcristais é sua aplicabilidade como biomateriais. Entende-se por biomaterial toda substância que, sozinha ou compondo um sistema, é utilizada para direcionar um procedimento terapêutico ou de diagnóstico³⁰. Sendo assim, sua utilização não pode resultar em efeitos adversos prejudiciais ao organismo do hospedeiro. Ou seja, é preciso assegurar que o material em questão cumpra a sua função principal e, ainda, não seja tóxico, antigênico, alergênico e carcinogênico³⁰. Desta forma, apesar da ausência de citotoxicidade e genotoxicidade de α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄ previamente demonstradas, ainda foi necessário comprovar a não existência de resposta inflamatória exacerbada para que esses microcristais possam ser classificados como biomateriais promissores para futura aplicação clínica. Estes aspectos são fundamentais para prevenir a rejeição dos materiais pelos tecidos adjacentes.

No que diz respeito aos aspectos da antigenicidade, de forma geral, pode-se afirmar que o processo inflamatório é um mecanismo do organismo contra injúrias, como infecções microbianas, fatores físicos e substâncias químicas³¹⁻³³ que, se bem-sucedido, resulta nos processos de reparação tecidual e restauração da função biológica³¹. Esse processo pode ser considerado agudo ou crônico, e estes diferem quanto ao tempo de duração, tipos de células recrutadas, bem como citocinas produzidas e secretadas³¹. Durante o processo infeccioso por *C. albicans* é possível detectar aumento na produção de interleucina (IL)-6, IL-8, IL-1 β e fator de necrose tumoral alfa (TNF α)³⁴⁻³⁶. Essas citocinas também estão envolvidas no processo de resposta imunológica aos biomateriais³⁷. De acordo com a literatura, pacientes com candidose oral apresentam níveis séricos de IL-6 elevados quando comparados aos pacientes saudáveis³⁸. Esta citocina é produzida por macrófagos, células B, células T, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais^{32,39}, sendo uma de suas principais

funções induzir a maturação de células B em células secretoras de imunoglobulinas⁴⁰, além de induzir um rápido aumento de neutrófilos na corrente sanguínea, de forma a tentar solucionar o processo infeccioso⁴¹. Apesar de ser uma citocina pró-inflamatória, IL-6 também exerce atividades regenerativas e anti-inflamatórias em determinadas condições⁴².

A IL-8 é outra citocina importante nos processos inflamatórios mediados por infecções causadas por *C. albicans*, atuando, principalmente, no recrutamento quimiotático de neutrófilos³². Além disso, essa interleucina também é responsável pela migração e ativação de monócitos, linfócitos, basófilos e eosinófilos³². A IL-8 é secretada por monócitos, macrófagos⁴³, queratinócitos³⁹ e fibroblastos^{44,45}, e estimula a produção de IL-1 β e TNF α ⁴⁶. A IL-1 β desempenha um papel central como mediadora de diversas respostas inflamatórias⁴⁶ e atua no hipotálamo como pirógeno endógeno^{47,48}. Esta citocina, secretada principalmente por células do sistema imune, como macrófagos e monócitos, assim como queratinócitos e fibroblastos^{32,49}, pode ter sua produção induzida por TNF α , outra citocina pró-inflamatória³⁹. TNF α é um potente mediador inflamatório³² produzido por diversos tipos celulares como queratinócitos, fibroblastos, macrófagos e monócitos^{32,46}. Esta citocina induz a secreção de colagenase pelos fibroblastos, ativa osteoclastos e induz a reabsorção óssea, estando relacionada a doenças como a periodontite³⁹. Ambas, IL-1 β e TNF α , estimulam fibroblastos gengivais a produzirem IL-6⁴⁶, além de estimularem fibroblastos e queratinócitos na produção de metaloproteinases da matriz (MMPs), que degradam componentes da matriz extracelular tecidual^{39,46,50}.

A correta modulação da resposta imunológica, juntamente com elementos fundamentais do processo de reparação tecidual, contribui de forma significativa para o sucesso no desenvolvimento de novos biomateriais. Nesse contexto, as metaloproteinases da matriz (MMPs) são um grupo de endopeptidases zinco-dependentes^{51,52} que estão envolvidas nos processos fisiológicos de remodelação tecidual, degradação fisiológica de proteínas da matriz extracelular e da membrana basal⁵¹⁻⁵³. As MMPs são produzidas na forma de pró-enzimas, secretadas por monócitos, fibroblastos, macrófagos, queratinócitos e células endoteliais^{51,54} e, na ausência de inflamação, lesão e processos patológicos, sua atividade e expressão são mantidas em baixos níveis⁵⁵. A ativação de pró-MMPs pode ocorrer de forma intracelular, através das MMPs associadas à membrana, ou extracelular, por outras proteases, como por exemplo, a cisteína proteinase, as proteinases de *Candida* spp.,

as proteínas de algumas bactérias e espécies reativas de oxigênio⁵⁵. Além disso, MMPs ativas podem participar da ativação de outras MMPs em cascatas de ativação mútuas⁵⁵.

Na fisiopatologia da cavidade oral, a MMP-8, também denominada colagenase 2, e a MMP-9, também denominada gelatinase B, têm sido relacionadas ao desenvolvimento e progressão da doença periodontal, sendo as duas MMPs predominantes no fluido crevicular gengival de sítios com periodontite, bem como no fluido sulcular peri-implantar de sítios com periimplantite⁵⁵. A MMP-8 é sintetizada por leucócitos polimorfonucleares durante sua maturação, mas também pode ser expressa por condrócitos, fibroblastos, queratinócitos orais e células endoteliais⁵². A literatura relata que a MMP-8 é capaz de induzir a liberação de citocinas anti-inflamatórias e quimiocinas, como por exemplo MCP-1 (proteína quimioatraente de monócitos 1 - *monocyte chemoattractant protein 1*) e MCP-2⁵⁶, bem como atuar na regulação da resposta imune e apoptose de células inflamatórias⁵⁵. A MMP-9 está estreitamente relacionada com a degradação de colágeno tipo IV⁵¹ presente no tecido conjuntivo e pode ser expressa por macrófagos, leucócitos, queratinócitos e osteoclastos^{52,55}. O aumento na produção de MMP-9 está relacionado aos estágios iniciais de reparação tecidual, mas também em doenças inflamatórias, como a periodontite e a peri-implantite⁵⁵.

Embora a rejeição de um biomaterial seja um desfecho comum na prática clínica, os protocolos preconizados atualmente ainda não incluíram testes imunogênicos nos critérios de avaliação dos dados iniciais de um novo material³⁷. Ensaio *in vitro* que avaliem a citotoxicidade, maturação e ativação de células do sistema imune podem conferir indícios a respeito da resposta imune desencadeada por novos biomateriais e devem ter como principal objetivo avaliar respostas exacerbadas³⁷. Embora estes dados sozinhos não possam ser extrapolados para a prática clínica, quando devidamente empregados, são eficientes durante o desenvolvimento inicial (pré-clínico) dos biomateriais³⁷.

Apesar dos avanços no entendimento das propriedades antimicrobianas dos microcristais α -Ag₂WO₄, β -Ag₂MoO₄ e α -AgVO₃, nenhum resultado concreto em biofilmes havia sido descrito até o presente trabalho. Do mesmo modo, os primeiros estudos sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias e MMPs por esses microcristais foram alcançados nesta tese e, de forma inédita, desenvolvemos e aplicamos um modelo de co-cultivo tridimensional contendo células inflamatórias. De

forma geral, todos os parâmetros aqui abordados são considerados essenciais para uma futura aplicação destes microcristais em revestimentos ou na sua incorporação em materiais de uso médico-odontológico.

5 CONCLUSÃO

Diante dos objetivos propostos e resultados obtidos, foi possível concluir que:

α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄ foram considerados levementes citotóxicos ou não citotóxicos para as células THP-1 e macrófagos;

Foi observada resposta oxidativa às células THP-1 e macrófagos expostas aos microcristais;

Nas células THP-1 e macrófagos, foi observado aumento na produção de IL-8, independentemente dos microcristais avaliados. Além disso, macrófagos apresentaram aumento na produção de IL-1 β , exceto quando expostos a α -AgVO₃ [3,9 μ g/mL];

THP-1 apresentou redução na produção de MMP-9 quando exposto a α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄. A produção de MMP-8 por THP-1 não foi detectada em nenhuma situação avaliada. Foi observada diminuição nos níveis de MMP-8 e -9 em macrófagos expostos aos microcristais;

O modelo de co-cultivo 3D proposto se mostrou promissor para avaliação da biocompatibilidade dos microcristais e dos processos infecciosos por biofilme de *C. albicans*;

Dentre todos os microcristais testados, apenas α -AgVO₃ (15,62 μ g/mL) apresentou citotoxicidade sobre o modelo de co-cultivo 3D;

Apenas α -Ag₂WO₄ apresentou atividade contra biofilme de *C. albicans* semelhante ao controle com fármaco padrão;

α -Ag₂WO₄ induziu a produção de IL-6 e IL-8 em níveis semelhantes aos observados nos modelos de co-cultivo 3D infectados e não infectados, tratados com este microcristal. Resultado semelhante foi observado para β -Ag₂MoO₄, com relação a citocina IL-8;

A exposição dos modelos de co-cultivo 3D ao microcristal α -AgVO₃ (3,9 μ g/mL e 15,62 μ g/mL) não interferiu na produção das citocinas estudadas;

Foi observada diminuição na produção de TNF α por β -Ag₂MoO₄, tanto em relação ao grupo controle como aos modelos de co-cultivo 3D infectados por *C. albicans*.

REFERÊNCIAS*

1. Radaic A, Kapila YL. The oralome and its dysbiosis: new insights into oral microbiome-host interactions. *Comput Struct Biotechnol J*. 2021; 19: 1335–60.
2. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L et al. Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16(1): e139-43.
3. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2004; 12(7): 317–24.
4. Pellon A, Sadeghi Nasab SD, Moyes DL. New insights in *Candida albicans* innate immunity at the mucosa: toxins, epithelium, metabolism, and beyond. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020; 10: 1–14.
5. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Giannini MJSM. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013; 62: 10–24.
6. Avila M, OjciusDM, Yilmaz Ö. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol*. 2009; 28(8): 405–11.
7. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011; 75(2): 213–67.
8. Dantas AS, Lee KK, Raziunaite I, Schaefer K, Wagener J, Yadav B et al. Cell biology of *Candida albicans*–host interactions. *Curr Opin Microbiol*. 2016; 34: 111–8.
9. Ganguly S, Mitchell AP. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 2011; 14: 380–5.
10. Silva S, Rodrigues CF, Araújo D, Rodrigues ME, Henriques M. *Candida* species biofilms' antifungal resistance. *J Fungi*. 2017; 3(1): 8.
11. Andriole VT. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal therapy. *Int J Antimicrob Agents*. 2000; 16: 317–21.
12. Srinivasan A, Lopez-Ribot JL, Ramasubramanian AK. Overcoming antifungal resistance. *Drug Discov Today Technol*. 2014; 11: 1-116.
13. Panáček A, Kolář M, Večeřová R, Pruček R, Soukupová J, Kryštof V et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*. 2009; 30: 6333–40.
14. Kim KJ, Sung WS, Suh BK, Moon SK, Choi JS, Kim JG et al. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *BioMetals*. 2009; 22: 235–42.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

15. Lipovsky A, Nitzan Y, Gedanken A, Lubart R. Antifungal activity of ZnO nanoparticles-the role of ROS mediated cell injury. *Nanotechnology*. 2011; 22(10): 105101.
16. Junqueira JC, Jorge AOC, Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SFG, Costa ACBP et al. Photodynamic inactivation of biofilms formed by *Candida* spp., *Trichosporon mucoides*, and *Kodamaea ohmeri* by cationic nanoemulsion of zinc 2,9,16,23-tetrakis(phenylthio)-29H, 31H-phthalocyanine (ZnPc). *Lasers Med Sci*. 2012; 27(6): 1205-12.
17. Dovigo LN, Carmello JC, Carvalho MT, Mima EG, Vergani CE, Bagnato VS et al. Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine®. *Biofouling*. 2013; 29(9): 1057–67.
18. Longo VM, Foggi CC, Ferrer MM, Gouveia AF, André RS, Avansi W et al. Potentiated electron transference in α -Ag₂WO₄ microcrystals with Ag nanofilaments as microbial agent. *J Phys Chem A*. 2014; 118: 5769–78.
19. Fabbro MT, Foggi CC, Santos LPS, 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.
20. Oliveira RC, Foggi CC, Teixeira MM, Silva MDP, Assis M, Francisco EM et al. Mechanism of antibacterial activity via morphology change of α -AgVO₃: theoretical and experimental insights. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017; 9: 11472–81.
21. Foggi CC, Fabbro MT, Santos LPS, Santana YVB, Vergani CE, Machado AL et al. Synthesis and evaluation of α -Ag₂WO₄ as novel antifungal agent. *Chem Phys Lett*. 2017; 674: 125–9.
22. Foggi CC, Oliveira RC, Fabbro MT, Vergani CE, Andres J, Longo E et al. Tuning the morphological, optical, and antimicrobial properties of α -Ag₂WO₄ microcrystals using different solvents. *Cryst Growth Des*. 2017; 17, 6239–46.
23. Pimentel BNAS, Foggi CC, Barbugli PA, Oliveira RC, Avila ED, Longo E et al. Antifungal activity and biocompatibility of α -AgVO₃ microcrystals: a promising material against oral *Candida* disease. *Mater Sci Eng C*. 2020; 108: 110405.
24. Haro Chávez NL, Avila ED, Barbugli PA, Oliveira RC, Foggi CC, Longo E et al. Promising effects of silver tungstate microcrystals on fibroblast human cells and three dimensional collagen matrix models: a novel non-cytotoxic material to fight oral disease. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018; 170: 505–13.
25. Assis M, Robeldo T, Foggi CC, Kubo AM, Mínguez-Vega G, Condoncillo E et al. Ag Nanoparticles/ α -Ag₂WO₄ composite formed by electron beam and femtosecond irradiation as potent antifungal and antitumor agents. *Sci Rep*. 2019; 9: 9927.
26. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014; 24: R453–62.
27. 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.

28. Brohem CA, Cardeal LBS, Tiago M, Soengas MS, Barros SBM, Maria-Engler SS. Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010; 24: 35–50.
29. Mazzoleni G, Di Lorenzo D, Steimberg N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes Nutr.* 2009; 4: 13–22.
30. Hudecki A, Kiryczyński G, Łos MJ. Biomaterials, definition, overview. In: Łos MJ, Hudecki A, Wiecheć. *Stem cells and biomaterials for regenerative medicine.* Cambridge: Academic Press; 2019. p. 85–98.
31. Kumar V, Abbas A, Aster J. Inflamação e reparo. In: Kumar V, Abbas A, Aster J. *Robbins: patologia básica.* 9th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. p. 29–73.
32. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2014; 1843(11): 2563–82.
33. Silva L. A literature review of inflammation and its relationship with the oral cavity. *Glob J Infect Dis Clin Res.* 2015; 2(1): 1–7.
34. Dongari-Bagtzoglou A, Wen K, Lamster IB. *Candida albicans* triggers interleukin-6 and interleukin-8 responses by oral fibroblasts in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* 1999; 14: 364–70.
35. Wollina U, Künkel W, Bulling L, Fünfstück C, Knöll B, Wennewald I et al. *Candida albicans*-induced inflammatory response in human keratinocytes. *Mycoses.* 2004; 47: 193–9.
36. Nash EE, Peters BM, Palmer GE, Fidel PL, Noverr MC. Morphogenesis is not required for *Candida albicans*-*Staphylococcus aureus* intra-abdominal infection-mediated dissemination and lethal sepsis. *Infect Immun.* 2014; 82(8): 3426–35.
37. Lock A, Cornish J, Musson DS. The role of in vitro immune response assessment for biomaterials. *J Funct Biomater.* 2019; 10(3): 31.
38. Yamamoto T, Yoneda K, Ueta E, Osaki T. Serum cytokines, interleukin-2 receptor, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in oral disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78: 727–35.
39. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9(3): 248–66.
40. Bartold PM, Haynes DR. Interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 1991; 26: 339–45.
41. Dalrymple SA, Lucian LA, Slattery R, McNeil T, Aud DM, Fuchino S et al. Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: correlation with inefficient neutrophilia. *Infect Immun.* 1995; 63(6): 2262–8.
42. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2011; 1813(5): 878–88.
43. Desai A, Darland G, Bland JS, Tripp ML, Konda VR. META060 attenuates TNF- α -activated inflammation, endothelial-monocyte interactions, and matrix metalloproteinase-9 expression, and inhibits NF- κ B and AP-1 in THP-1 monocytes. *Atherosclerosis.* 2012; 223(1): 130–6.

44. Egusa H, Nikawa H, Makihira S, Yatani H, Hamada T. In vitro mechanisms of interleukin-8-mediated responses of human gingival epithelial cells to *Candida albicans* infection. *Int J Med Microbiol*. 2006; 296(4-5): 301–11.
45. Egusa H, Nikawa H, Makihira S, Jewett A, Yatani H, Hamada T. Intercellular adhesion molecule 1-dependent activation of interleukin 8 expression in *Candida albicans*-infected human gingival epithelial cells. *Infect Immun*. 2005; 73: 622–6.
46. Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y. perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. *J Periodontol*. 2003; 74(1): 103–10.
47. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Imunidade inata. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 7th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. p. 55–88.
48. Varella PPV, Forte WCN. Citocinas: revisão. *Rev Bras Alergia Imunopatol*. 2001; 24(4): 146–54.
49. Ren K, Torres R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Res Rev*. 2009; 60(1): 57–64.
50. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol*. 1993; 64: 474–84.
51. Araújo RVS, Silva FO, Melo-Júnior MR, Porto ALF. Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. *Rev Ciênc Méd Biol*. 2011; 10(1): 82–8.
52. Ravanti L, Kahari V. Matrix metalloproteinases in wound repair (Review). *Int J Mol Med*. 2000; 6: 391–407.
53. Buduneli E, Vardar-Sengül S, Buduneli N, Atilla G, Wahlgren J, Sorsa T. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and laminin-5 γ 2 chain immunolocalization in gingival tissue of endotoxin-induced periodontitis in rats: effects of low-dose doxycycline and alendronate. *J Periodontol*. 2007; 78: 127–34.
54. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand*. 2007; 65(1): 1–13.
55. Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HS et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med*. 2006; 38(5): 306–21.
56. Balbín M, Fueyo A, Tester AM, Pendás AM, Pitiot AS, Astudillo A et al. Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nat Genet*. 2003; 35(3): 252–7.
57. Martínez-Gutierrez F, Thi EP, Silverman JM, Oliveira CC, Svensson SL, Hoek AV et al. Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles. *Nanomed: Nanotechnol Biol Med*. 2012; 8(3): 328–36.
58. Martinez-Gutierrez F, Boegli L, Agostinho A, Sánchez EM, Bach H, Ruiz F et al. Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. *Biofouling*. 2013; 29(6): 651–60.

59. Monteiro DR, Silva S, Negri M, Gorup LF, Camargo ER, Oliveira R et al. Silver nanoparticles: influence of stabilizing agent and diameter on antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Lett Appl Microbiol*. 2012; 54: 383–91.
60. Monteiro DR, Takamiya AS, Feresin LP, Gorup LF, Camargo ER, Delbem ACB et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms to silver nanoparticles in intermediate and mature development phases. *J Prosthodont Res*. 2014; 59(1): 42–8.
61. Zhu H, Hu C, Zhang F, Feng X, Li J, Liu T et al. Preparation and antibacterial property of silver-containing mesoporous 58S bioactive glass. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014; 42: 22–30.
62. Shang B, Xu M, Zhi Z, Xi Y, Wang Y, Peng B et al. Synthesis of sandwich-structured silver@polydopamine@silver shells with enhanced antibacterial activities. *J Colloid Interface Sci*. 2019; 558: 47–54.
63. Lara HH, Romero-Urbina DG, Pierce C, Lopez-Ribot JL, Arellano-Jiménez MJ, Jose-Yacaman M. Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. *J Nanobiotechnol*. 2015; 13: 91.
64. Chernousova S, Epple M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angew Chem Int Ed*. 2013; 52: 1636–53.
65. Yu Z, Li Q, Wang J, Yu Y, Wang Y, Zgou Q et al. Reactive oxygen species-related nanoparticle toxicity in the biomedical field. *Nanoscale Res Lett*. 2020; 15: 115.
66. Flores-López LZ, Espinoza-Gómez H, Somanathan R. Silver nanoparticles: electron transfer, reactive oxygen species, oxidative stress, beneficial and toxicological effects. Mini review. *J Appl Toxicol*. 2019; 39: 16–26.
67. Murphy A, Casey A, Byrne G, Chambers G, Howe O. Silver nanoparticles induce pro-inflammatory gene expression and inflammasome activation in human monocytes. *J Appl Toxicol*. 2016; 36: 1311–20.
68. Park MVDZ, Neigh AM, Vermeulen JP, de la Fonteyne LJJ, Verharen HW, Briedé JJ et al. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*. 2011; 32(36): 9810–7.
69. Franco C, Patricia HR, Timo S, Claudia B, Marcela H. Matrix metalloproteinases as regulators of periodontal inflammation. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(2): 440.
70. Heidinger M, Kolb H, Krell HW, Jochum M, Ries C. Modulation of autocrine TNF- α -stimulated matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression by mitogen-activated protein kinases in THP-1 monocytic cells. *Biol Chem*. 2006; 387: 69–78.
71. Soll DR. *Candida* biofilms: is adhesion sexy? *Curr Biol*. 2008; 18(16): 717–20.
72. Dias KC, Sousa DL, Barbugli PA, Cerri PS, Salih VM, Vergani CE. Development and characterization of a 3D oral mucosa model as a tool for host-pathogen interactions. *J Microbiol Methods*. 2018; 152: 52–60.
73. Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H. *Candida albicans* triggers interleukin-8 secretion by oral epithelial cells. *Microb Pathog*. 2003; 34(4): 169–77.
74. Gow NAR, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol*. 2012; 15(4): 406–12.

75. Qin Y, Zhang L, Xu Z, Zhang J, Jiang YY, Cao Y et al. Innate immune cell response upon *Candida albicans* infection. *Virulence*. 2016; 7(5): 512–26.
76. Richardson JP, Moyes DL, Ho J, Naglik JR. *Candida* innate immunity at the mucosa. *Semin Cell Dev Biol*. 2019; 89: 58–70.
77. Cheng SC, Joosten LAB, Kullberg BJ, Netea MG. Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect Immun*. 2012; 80: 1304–13.
78. Szolnoky G, Bata-Csörgö Z, Kenderessy AS, Kiss M, Pivarcsi A, Novák Z et al. A mannose-binding receptor is expressed on human keratinocytes and mediates killing of *Candida albicans*. *J Invest Dermatol*. 2001; 117(2): 205–13.
79. Rennekampff HO, Hansbrough JF, Kiessig V, Doré C, Sticherling M, Schröder JM. Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing. *J Surg Res*. 2000; 93(1): 41–54.