



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.

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: Prof^a. Dr^a. Karin Hermana Neppelenbroek

3º Examinador: Prof^a. Dr^a. 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 acalantar. 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, **Prof^a. Dr^a. Paula Volpato Sanitá**, **Prof^a. Dr^a. Janaína Habib Jorge**, **Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Pavarina** e **Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima**, bem como à **Prof^a. Dr^a. Marlise Inêz Klein**, pela ótima convivência e grandes ensinamentos. Tenham a certeza de que aprendi muito com cada um de vocês!

À **Prof^a. Dr^a. 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, **Dr^a. 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, **Prof^a. Dr^a. Janaína Habib Jorge**, **Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Pero** e **Prof^a. Dr^a. 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, **Prof^a. Dr^a. Karin Hermana Neppelenbroek**, **Prof^a. Dr^a. 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*, pesar 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 (proeases, 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 – $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ ^{18,21,22}, molibdato de prata – $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ ¹⁹, vanadato de prata – $\alpha\text{-AgVO}_3$ ²⁰). 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 collagenase 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 collagenase 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.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a biocompatibilidade e a modulação da resposta inflamatória pelos microcristais α -Ag₂WO₄, β -Ag₂MoO₄ e α -AgVO₃ sobre células THP-1 e macrófagos, tanto em modelo de monocamada, como em modelo de co-cultivo tridimensional (3D), bem como avaliar a sua atividade antifúngica em biofilme de *C. albicans*.

2.1 Objetivos Específicos

Avaliar a viabilidade das células inflamatórias THP-1 e macrófagos, após exposição aos microcristais α -Ag₂WO₄, β -Ag₂MoO₄ e α -AgVO₃;

Avaliar, nas células THP-1 e macrófagos, a produção da espécie reativa de oxigênio, superóxido, assim como a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, IL-1 β e TNF α) e de metaloproteinases da matriz (MMP -8 e 9), após exposição aos microcristais α -Ag₂WO₄, β -Ag₂MoO₄ e α -AgVO₃;

Desenvolver e validar um modelo de co-cultivo tridimensional (3D) envolvendo três linhagens celulares (queratinócitos, fibroblastos e células inflamatórias);

Avaliar a biocompatibilidade dos microcristais α -Ag₂WO₄, β -Ag₂MoO₄ e α -AgVO₃ sobre os modelos de co-cultivo 3D;

Avaliar a ação dos microcristais sobre biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos nos modelos de co-cultivo 3D;

Avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, IL-1 β e TNF α) nos modelos de co-cultivo 3D, com e sem infecção por *C. albicans*, após sua exposição aos microcristais α -Ag₂WO₄, β -Ag₂MoO₄ e α -AgVO₃.

3 PUBLICAÇÕES

3.1 Publicação 1*

Cytotoxicity and inflammatory response of silver vanadate (α -AgVO₃), silver tungstate (α -Ag₂WO₄), and silver molybdate (β -Ag₂MoO₄) microcrystals

Authors: Bruna Natália Alves da Silva Pimentel^a, Paula Aboud Barbugli^a, Marcelo Assis^b, Elson Longo^b, Carlos Eduardo Vergani^{a*}

^aSão Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, 1680 Humaitá St., 14801-903 Araraquara, SP, Brazil

^bCDMF, LIEC, Federal University of São Carlos (UFSCar), P.O. Box 676, 13565-905, São Carlos, SP, Brazil

*Corresponding author's email: carlos.vergani@unesp.br

Highlights

- Silver-containing microcrystals exhibited low cytotoxicity on human monocytes and macrophages;
- Silver-containing microcrystals increased the production of O₂⁻;
- Silver-containing microcrystals modulated the production of TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, MMP-8, and MMP-9 in a cell phenotype-dependent manner.

* Artigo submetido e formatado de acordo com o periódico *Toxicology Letters* (ANEXO A).

Abstract

Silver vanadate (α -AgVO₃), silver tungstate (α -Ag₂WO₄), and silver molybdate (β -Ag₂MoO₄) microcrystals have shown interesting antimicrobial activities. However, their biocompatibility should be extensively evaluated for safe use. The present investigation evaluated redox signaling and the production of cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6, and IL-8) and matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9). Cytotoxicity and the inflammatory response of silver-containing microcrystals were analyzed in monocytes and macrophages cells with the alamarBlue™ assay, flow cytometry, confocal microscopy, and ELISA. The results showed that α -AgVO₃ at a minimum inhibitory concentration (3.9 μ g/mL) did not affect cell viability. The α -AgVO₃ at a minimum fungicidal concentration (15.62 μ g/mL), α -Ag₂WO₄ (7.81 μ g/mL), and β -Ag₂MoO₄ (15.62 μ g/mL) slightly decreased cell viability. All silver-containing microcrystals induced the production of O₂⁻ and this effect was mitigated by Reactive Oxygen Species (ROS) scavenger and N-acetylcysteine (NAC). Monocytes presented an increase in IL-8 after contact with silver-containing microcrystals, while macrophages showed an increase in IL-1 β and IL-8. Monocytes did not release MMP-8 in any condition, while the release of MMP-9 decreased in the presence of α -Ag₂WO₄ and β -Ag₂MoO₄. Regarding macrophages, the release of MMP-8 and -9 decreased in the presence of all microcrystals. Overall, every pathway studied showed a promising biocompatibility profile of α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ microcrystals.

Keywords: silver; cytokines; matrix metalloproteinases; reactive oxygen species; monocytes; macrophages.

1. Introduction

Surfaces with antimicrobial properties, such as prosthetic devices, are needed in the medical field to prevent microorganism attachment and biofilm growth and, consequently, medical device-related infections (Afewerki et al., 2020; Florea et al., 2020). Currently, several studies have evaluated the antimicrobial properties of medical-related materials functionalized with nanoparticles or antibiotics to improve their properties and prevent infections (Tran and Webster, 2013; Zhu et al., 2014; Castro et al., 2014, 2016a, 2016b; Hogan et al., 2019; Rangel et al., 2020; Verza et al., 2021). However, a limited number of studies have investigated their biocompatibility (Rangel et al., 2020; Verza et al., 2021; Zhu et al., 2014).

Silver has been used for centuries to treat infections and the use of silver and silver-containing particles has increased in the past few years (Politano et al., 2013). The literature shows that silver has antimicrobial properties against a range of microorganisms such as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans* (Kim et al., 2009; Panáček et al., 2009; Martínez-Gutierrez et al., 2012; Dizaj et al., 2014; Shang et al., 2019), with the latter representing an opportunistic fungus often found in the oral cavity (Sudbery et al., 2004; Avila et al., 2009; Shirliff et al., 2009; Salerno et al., 2011; Shapiro et al., 2011). *C. albicans* is present in 41.3% to 44.7% of cases of denture stomatitis in complete denture wearers (Caldeira et al., 2021) and it is the most frequent *Candida* spp. related to nosocomial bloodstream infections in hospitalized patients (about 60%). This is due to the use of broad-spectrum antibiotics, urinary catheters, and parenteral nutrition, which favor its adhesion and proliferation (Kir and Bahceci, 2020). Recently, it has been shown that different silver-containing microcrystals can affect *C. albicans* viability with minimal inhibitory and fungicidal concentration (MIC/MFC) values ranging from 3.9 µg/mL to 62.5 µg/mL, respectively, which implies a variation in the amount of silver between 0.017 µmol/mL and 0.136 µmol/mL (Fabbro et al., 2016; Foggi et al., 2017a, 2017b; Pimentel et al., 2020).

The cytotoxicity on mammalian cells should be evaluated when using silver as an antimicrobial agent. Depending on the particle size and concentration, silver may decrease cell metabolism, increase ROS production, cytokine release, and even programmed cell death (Foldbjerg et al., 2009, 2011; Liu et al., 2010; Park et al., 2011; Martínez-Gutierrez et al., 2012; Murphy et al., 2016). Previous studies showed that silver vanadate (α -AgVO₃), silver tungstate (α -Ag₂WO₄), and silver molybdate (β -

Ag_2MoO_4) have not shown any cytotoxic effect on both normal oral keratinocytes (NOK-si) and human gingival fibroblasts (FGH) grown in monolayer cultures (Haro Chávez et al., 2018; Assis et al., 2019; Pimentel et al., 2020). Also, studies showed that $\alpha\text{-AgVO}_3$ and $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ did not promote DNA degradation (Haro Chávez et al. 2018; Pimentel et al. 2020). Despite these favorable results, it is not possible to ensure biocompatibility for future applications in the medical field unless more specific studies addressing oxidative stress and inflammatory and extracellular matrix pathways are performed.

The inflammatory response is a high-complex and multi-step process during injuries and infections (Kumar et al., 2013; Turner et al., 2014). Inflammation is part of the immune response and aims to eliminate the offending agent and start the healing process with tissue and function restoration (Kumar et al., 2013). The literature reports that, although silver particles, especially nanoparticles, present unique chemical and physical properties responsible for their antimicrobial activity, this type of material can activate the immune response (Akter et al., 2018) and stimulate the immune system to produce several cytokines and other inflammatory mediators (Abdulkhaleq et al., 2018; Parks et al., 2004). Considering that $\alpha\text{-AgVO}_3$, $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, and $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ aim to be incorporated into dental materials and medical appliances to prevent oral infections, it is important to show the absence of an exacerbated inflammatory response. Moreover, the role of matrix metalloproteinases (MMPs), which are responsible for tissue remodeling and healing (Araújo et al., 2011), must be understood. The inhibition of MMPs without causing cytotoxic and genotoxic effects is desired in dental materials research, as it improves the longevity of dental restorations (Hashimoto et al., 2016).

The present study evaluated the cytotoxicity and the ability to induce the production of reactive oxygen species (ROS), pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF α , IL-6, and IL-8), and MMPs (-8 and -9) by human monocytes (THP-1 cells) and macrophages, after contact with three different silver-containing microcrystals ($\alpha\text{-AgVO}_3$, $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, and $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$).

2. Material and Methods (APÊNDICE A)

2.1 Silver-containing microcrystals

The synthesis and characterization of $\alpha\text{-AgVO}_3$, $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, and $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ microcrystals are fully described in previous studies (Foggi et al., 2017b; Fabbro et al., 2016; Oliveira et al., 2017). An amount of 1.10^{-3} mol of AgNO_3 (Cennabras, 99.98%)

was diluted in 50 mL of distilled water. Simultaneously, 1×10^{-3} mol of NH_4VO_3 (Aldrich, 99.99%) or 5×10^{-4} mol of $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich, 99.99%) or Na_2MoO_4 (Alpha Aesar, 99.98%) were diluted in 50 mL of distilled water. Temperatures of 10°C for $\alpha\text{-AgVO}_3$ and 70°C for $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ and $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ were used. After reaching the temperatures required, the solutions were mixed, instantly forming a precipitate. These precipitates were washed with distilled water to a pH of 7 and oven-dried at 60°C for 12 hours. After synthesis, all microcrystals were diluted in PBS at a stock concentration of 2 mg/mL. The microcrystal concentrations evaluated herein were based on previous studies according to the minimal inhibition concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) against *C. albicans*, as follows: $3.9 \mu\text{g/mL}$ and $15.62 \mu\text{g/mL}$ for $\alpha\text{-AgVO}_3$ (MIC and MFC, respectively) (Pimentel et al., 2020), $7.81 \mu\text{g/mL}$ for $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ (Foggi et al., 2017b), and $15.62 \mu\text{g/mL}$ for $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ (Fabbro et al., 2016). Considering the respective studies showed that $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ and $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ microcrystals had the same MIC and MFC values, only one concentration for each of these microcrystals was evaluated.

2.2 Cell culture

The human monocytes from peripheral blood (THP-1 cell) were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ; code 0234) and routinely cultured at 37°C in a 5% CO_2 -humidified environment in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), supplemented with 2 mM of glutamine (LONZA, Basel, Switzerland), 10 mM of HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1 mM of sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 4.5 g/L of glucose (Synth, Diadema, SP, Brazil), 1.5 g/L of sodium bicarbonate (Synth, Diadema, SP, Brazil), 1% of antibiotic/antimycotic solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10 % of fetal bovine serum (FBS; Gibco, Grand Island, NY, USA), and 0.09% of β -mercaptoethanol (Gibco, Grand Island, NY, USA). The THP-1 cells were seeded and differentiated into macrophages by adding 100 ng/mL of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Park et al., 2007) to the cell culture medium, which was maintained at 37°C in a 5% CO_2 -humidified environment. After 48 hours, the supernatant was discarded and the cells attached were washed twice with PBS. Subsequently, a fresh medium was added and maintained overnight. After seeding, THP-1 cells and macrophages were allowed to reach 80% of growth before sensitization with silver-containing microcrystals.

2.3 Cell viability assay

Cell viability after 24 hours of sensitization with silver-containing microcrystals was assessed with the alamarBlue™ assay. Cells at a concentration of 1×10^6 /well in RPMI medium with 5% FBS were seeded on 12-well plates at a final volume of 3 mL and maintained at 37°C in 5% CO₂ overnight. After 16 hours, the cells were washed with PBS, and the cell culture medium without FBS supplementation was added with pre-selected concentrations of silver-containing microcrystals. The plates were maintained at 37 °C in 5% CO₂ for 24 hours. Subsequently, the supernatants were collected in microtubes and stored at - 20 °C until the analysis of cytokine production. The cells were then incubated in a cell culture medium with 10% of alamarBlue™ reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After 4 hours, 200 µL of each well was transferred in quadruplicate to a black 96-well plate, and the fluorescence emission was read (excitation: 544 nm; emission: 590 nm; Fluoroskan Ascent II, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Standard cell culture conditions were used as control (CT) and cells incubated with 10 µL of lysis buffer solution (LB; Triton-x 100 9 %; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used as dead control. This assay was performed in quadruplicate and on three different occasions.

2.4 Intracellular ROS (O₂⁻) quantification

The production of superoxide (O₂⁻) induced by silver-containing microcrystals on THP-1 cells and macrophages was conducted with dihydroethidium (DHE; D23107; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), a probe capable of selectively detecting O₂⁻. Cells were seeded in a 96-well plate at a concentration of 2×10^4 cells/well in Krebs-Henseleit buffer (pH 7.0 + 0.2). Then, 200 µL of DHE (1:1000) was added to each well and the plates were maintained at 37 °C for 1 hour. Then, the α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ silver-containing microcrystals were added to the corresponding wells and the plates were maintained at 37 °C for 1 hour. The excess probe was removed and 100 µL of Krebs-Henseleit buffer was added to each well. The fluorescence emission was read in a fluorescence reader (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Cary, NC, USA; Ex.: 250-10nm; Em.: 620-10 nm). Cells under standard culture conditions were used as negative O₂⁻ control, hydrogen peroxide (H₂O₂; [0,125 mM]; Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA) as positive O₂⁻ control, and N-Acetyl-L-cysteine (NAC)

[0.01 mM] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as a scavenger. This assay was performed in quadruplicate and on three different occasions.

2.5 Intracellular ROS (O_2^-) detection by confocal laser scanning microscopy (CLSM)

For the CLSM assay, cells were seeded in a 48-well plate at a concentration of 3×10^4 cells/well and incubated with DHE. The α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ were added to the corresponding wells following the same protocol previously described (section 2.4). The CLSM images were obtained with an LSM 800 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) using a 561-nm laser, detection of brightfield and fluorescence spectra up to 700 nm, and a 20x objective. Cells under standard culture conditions were used as negative O_2^- control, hydrogen peroxide (H₂O₂; [0,125 mM]; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as positive O_2^- control, and NAC [0.01 mM] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as scavenger control.

2.6 Production of pro-inflammatory cytokines

The IL-1 β , TNF α , IL-6, and IL-8 cytokines produced after cell sensitization with silver-containing microcrystals were analyzed after 24 hours of contact with α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄, as described in section 2.3. The Human Inflammatory Cytokine Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) was used according to the manufacturer's instructions. The samples were analyzed with a FACS Aria cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and all data obtained were evaluated with the FCAP Array software v3 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

2.7 MMPs signaling

To evaluate the production of MMP-8 and -9, cells were seeded in 25-cm² flasks at a concentration of 5×10^5 cells/flask in RPMI culture medium containing 5% FBS and 5% CO₂ at 37 °C. After 16 hours, the cells were washed with PBS, and a fresh culture medium without FBS supplementation containing α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ microcrystals was added to the correspondent treatment flask. The cells were maintained at 37 °C in 5% CO₂ for 24 hours. Negative control cells (CT) were maintained under standard cell culture conditions, and the positive control of MMP production was performed with cells incubated with 1 μ g/mL of lipopolysaccharide (LPS). Subsequently, the supernatants were collected in microtubes and stored at - 20

°C until analysis. This assay was performed in duplicate on two independent occasions. Before the ELISA assay, the amount of total protein in each sample was measured with the Bradford protein assay (Bradford, 1976)(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) using bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as the standard. Spectrophotometric measurements were performed at 595 nm (EZ Read 400 Microplate Reader; BioChrom, Cambourne, CAM, UK). The MMPs (-8 and -9) produced were detected with the MMP-8 Human ELISA Kit (Abcam, Cambridge, CBE, United Kingdom) and MMP-9 SimpleStep ELISA Kit (Abcam, Cambridge, CBE, United Kingdom), according to the manufacturer's instructions. The final data were normalized by the amount of protein per sample. This assay was performed in triplicate.

2.8 Statistical analysis

All data obtained were analyzed for normality (Shapiro-Wilk's test) and homoscedasticity (Levene test). The statistical analysis of cell viability and O₂⁻ production was performed with one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc on the IBM SPSS Statistics software. For cytokine and MMP production, a 95% confidence interval (CI) was defined to compare the results between groups. A significance level of 5% was used.

3. Results

3.1 Cell viability

The effect of silver-containing microcrystals after 24 hours of contact with THP-1 cells and macrophages was evaluated using alamarBlue™ (Figure 1). For both cells, α-AgVO₃ at MIC (3.9 µg/mL) showed cell viability statistically similar to that of the control group (RPMI). Additionally, the α-AgVO₃ at MFC (15.62 µg/mL) and α-Ag₂WO₄ evaluation showed a slight decrease in cell viability, representing 73.96% and 77.30% of THP-1 cell viability and 70.36% and 90.58% of macrophage cell viability, respectively, with α-AgVO₃ at MFC concentration seeming more cytotoxic than α-Ag₂WO₄. When the β-Ag₂MoO₄ microcrystal was maintained in contact with THP-1 cells, the cell viability was around 69.29% but when in contact with macrophages, the cell viability was almost the same as that of the control group (RPMI).

Figure 1

The analysis of cytotoxicity according to the classification proposed by Lonroth and Dahl (2001, 2003) and Sletten and Dahl (1999) did not show cytotoxicity when THP-1 cells were treated with α -AgVO₃ at MIC, whereas α -AgVO₃ at MFC, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ seemed to be slightly cytotoxic. Regarding the macrophages, α -AgVO₃ at MIC, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ were non-cytotoxic, whereas α -AgVO₃ MFC presented slight cytotoxicity (Table 1).

Table 1. Classification of cytotoxicity concerning each cell line based on the percentage of viability normalized by the control group (cell under standard conditions) of each cell line. In parentheses is the classification by Lonroth and Dahl (2001, 2003) and Sletten and Dahl (1999). NC: non-cytotoxic; SC: slightly cytotoxic; MIC: minimal inhibitory concentration; MFC: minimal fungicidal concentration.

Cell	Microcrystals			
	α -AgVO ₃ MIC	α -AgVO ₃ MFC	α -Ag ₂ WO ₄	β -Ag ₂ MoO ₄
THP-1	91.69 % (NC)	73.96% (SC)	77.30% (SC)	69.29% (SC)
Macrophages	91.73% (NC)	70.36% (SC)	90.58% (NC)	102.84% (NC)

3.2 Intracellular O₂⁻ quantification

The generation of O₂⁻ by the cells after treatment with silver-containing microcrystals was evaluated with fluorescence emission using a DHE probe. The data were normalized by the control group (cells cultured under standard conditions). The treatment of THP-1 cells with silver-containing microcrystals increased the production of O₂⁻ by 8-fold. However, when cells were incubated with microcrystals and the NAC scavenger was added (+NAC), there was an expressive drop in O₂⁻ production (Figure 2A). The highest decrease was observed when THP-1 was treated with α -AgVO₃ MIC + NAC and α -Ag₂WO₄ + NAC.

The production of O₂⁻ by macrophages was similar to that of cells under standard culture conditions but with a minor increase in O₂⁻ production when the cells were stimulated with α -AgVO₃ at MFC and β -Ag₂MoO₄. Nevertheless, similar to THP-1,

there was an expressive decrease in O_2^- production in the presence of NAC when macrophages were treated with all microcrystals (Figure 2B).

Figure 2

The CLSM images confirmed the data obtained with the fluorescence emission. The THP-1 (Figure 3) and macrophages (Figure 4) treated with H_2O_2 showed higher fluorescence than control (CT) (Figures 3A and B and 4A and B, respectively). The treatment with microcrystals also presented high fluorescence, which decreased when microcrystals were associated with NAC (Figures 3C-J and 4C-J).

Figure 3

Figure 4

3.3 Production of pro-inflammatory cytokines

The flow cytometry analysis showed that THP-1 cells produced only IL-8 at both 4 and 24 hours (Figures 5G and H, respectively). For this cell line, the contact with silver-containing microcrystals led to an increase in IL-8 production when compared to the control group (CT). According to the results, at both times, the order of IL-8 released was $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4 > \beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4 > \alpha\text{-AgVO}_3$ at MFC $> \alpha\text{-AgVO}_3$ at MIC. The other cytokines evaluated (IL-1 β , TNF α , and IL-6) were not detected in this cell line at both times (Figures 5A-F).

Figure 5

All cytokines were produced by macrophages cells (Figure 6). For all experimental groups, the production of TNF α , IL-6, IL-1 β , and IL-8 was lower than CT after 4 hours of treatment with silver-containing microcrystals (Figures 6A, C, E, and G). After 24 hours of stimulus, the production of TNF α and IL-6 was lower than the CT (Figures 6B and D, respectively). Overall, the production of IL-1 β and IL-8 increased at 24 hours, with $\alpha\text{-AgVO}_3$ at MFC and $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ showing higher production of IL-1 β and IL-8, respectively (Figures 6F and H). The only exception was observed when macrophage cells were stimulated with $\alpha\text{-AgVO}_3$ at MIC for 24 hours, leading to a decrease in IL-1 β production (Figure 6F).

Figure 6

3.4 Production of MMP-8 and -9

The release of MMPs by THP-1 and macrophages after 24 hours of contact with silver-containing microcrystals was measured by the ELISA. The data showed that THP-1 cells could not produce MMP-8 even under standard cell culture conditions or in the presence of LPS (Figure 7A). The release of MMP-9 was not detected when these cells were stimulated with α -AgVO₃ at MFC, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ (Figure 7B). The small amount of MMP-9 released after 24 hours of contact with α -AgVO₃ at MIC was not statistically different from the control group.

Figure 7

When evaluating the release of MMP-8 and -9 by macrophages cells, it was noted that all microcrystals reduced the amount of MMP-8 released. Also, MMP-8 was not detected when these cells were maintained in contact with α -AgVO₃ at MFC for 24 hours (Figure 8A). The stimuli of macrophage cells with α -AgVO₃ MIC, α -AgVO₃ MFC, and α -Ag₂WO₄ resulted in a lower MMP-9 release than control cells. Only macrophage cells stimulated with β -Ag₂MoO₄ released an amount of MMP-9 similar to the control culture.

Figure 8

4. Discussion

The use of silver as an antimicrobial agent has been extensively studied in the last few years. At the nanoscale, silver has shown excellent antimicrobial properties, especially inducing the production of reactive oxygen species (ROS) (Carlson et al., 2008; Liu et al., 2010; Park et al., 2011; Akter et al., 2018). However, the generation of ROS could also be responsible for cytotoxic effects on mammalian cells (Carlson et al., 2008; Foldbjerg et al., 2009, 2011; Nishanth et al., 2011). Moreover, silver concentration has been reported as a toxic factor to be considered, relating the concentration range between 10-100 μ g/mL to toxic effects on human cells (Chernousova and Epple, 2013). To optimize antimicrobial properties and improve silver biocompatibility, researchers have synthesized silver-containing microcrystals and other metal oxide, such as vanadate (VO₃), tungstate (WO₄), and molybdate (MoO₄). The α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ have presented antimicrobial activity against important microorganisms such as *C. albicans* (Fabbro et al., 2016; Foggi et al., 2017a, 2017b; Assis et al., 2019; Pimentel et al., 2020), methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) (Longo et al., 2014; Oliveira et al., 2017; Assis et al. 2018;

Foggi et al., 2020), and *Escherichia coli* (Foggi et al. 2020), reducing between 3 log₁₀ (CFU/mL) and 6 log₁₀ (CFU/mL) (Longo et al., 2014; Fabbro et al., 2016; Foggi et al., 2017a, 2017b; Oliveira et al., 2017; Pimentel et al., 2020) without causing damages to NOK-si and FGH, which are both human cells (Haro Chávez et al., 2018; Assis et al., 2019; Pimentel et al., 2020). The results reported herein showed a slight decrease in cell viability after 24 hours of contact with α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ microcrystals, which may relate partly to the silver content and its ability to produce reactive oxygen species. According to previous theoretical studies, these silver-containing microcrystals are formed by complex clusters connected by weak interactions and, when in an aqueous environment, these clusters can break water molecules into hydroxyl radicals and protons (OH[•] and H[•]). Simultaneously, there is an electron transfer to oxygen molecules (O₂), forming O₂⁻, which interacts with the proton (H[•]) to form the radical HO₂[•] (Oliveira et al., 2017; Fabbro et al., 2016; Foggi et al., 2017b). In the silver-containing microcrystals used in this study, the amount of silver was 0.0039 µg/mL for α -AgVO₃ MIC (Pimentel et al., 2020), 0.0157 µg/mL for α -AgVO₃ MFC (Pimentel et al., 2020), 0.0153 for α -Ag₂WO₄ (Haro Chávez et al., 2018), and 0.0312 µg/mL for β -Ag₂MoO₄. Such concentrations are extremely lower when compared to those in silver nanoparticles already described (Martínez-Gutierrez et al., 2012, 2013).

Regarding REDOX signaling, metal particles can indirectly induce ROS production due to the presence of metal ions. This oxidative stress can be responsible for the cytotoxicity of metal particles, considering that an increase in ROS generation can lead to cell damage and even cell death (Hashimoto et al., 2016). In this work, silver-containing microcrystals induced the production of superoxide (O₂⁻) - a specific ROS molecule - by monocyte and macrophages cells. When these cells were incubated with silver-containing microcrystals, there was an increase in O₂⁻ production. However, when the NAC ROS scavenger was put in contact with the cells together with the microcrystals, the O₂⁻ signaling was reversed. This was already expected because NAC is a ROS scavenger, proving for the first time the intracellular redox mechanism of these silver-containing microcrystals (Aruoma et al., 1989; Benrahmoune et al., 2000). According to the literature, ROS, including anion superoxide (O₂^{•-}), activates the NF-κB (nuclear factor kappa B) and MAPK (mitogen-activated protein kinase) pathways, which are responsible for stimulating IL-1β, TNFα and IL-6 genes (Ndenguele et al., 2005; Martínez-Gutierrez et al., 2012; Murphy et al., 2016). Thus, the presence

of ROS in the culture environment can stimulate the cells to produce pro-inflammatory cytokines (Martínez-Gutierrez et al., 2012). This may occur by oxidative stress, which is induced when the antioxidant ability of the cells is overcome by ROS generation (Park et al., 2011). In the present study, despite the high production of O_2^- by monocytes, there was no detection of IL-1 β , TNF α , and IL-6. However, there was an increase in IL-8 at both times analyzed (4 and 24 hours). Furthermore, the exposure of macrophages to silver-containing microcrystals resulted in a decreased production of the IL-1 β , TNF α , IL-6, and IL-8 pro-inflammatory cytokines after 4 hours. Such a decrease in production was maintained after 24 hours for TNF α and IL-6, while the production of IL-1 β and IL-8 increased. Previous findings reported macrophage inflammatory responses caused by silver nanoparticles (Martínez-Gutierrez et al., 2012; Murphy et al., 2016). This may be related to the higher amount of ROS generated by silver nanoparticles due to their relatively large surface area (Park et al., 2011) compared to microcrystals. Another explanation is that nanoparticles can penetrate cell membranes and form clusters inside cell cytoplasm, inducing the inflammatory process (Martínez-Gutierrez et al., 2012), which does not happen with microcrystals because of their larger size. The findings hereby reported showed that even with the high production of O_2^- , this was easily reversed in the presence of a ROS scavenger, proving that O_2^- production by these particles could be self-limited and consequently less capable of inducing greater inflammatory responses. Thus, the low cytotoxicity of α -AgVO₃ MIC and α -Ag₂WO₄ could be explained by the reversible REDOX signaling by O_2^- , which is considered an important property in both these microcrystals. Additionally, the literature reports that, among the ROS produced by cells, the O_2^- pathway is less harmful (Schieber and Chandel, 2014).

The present investigation also showed that when THP-1 and macrophages were stimulated with silver-containing microcrystals, the production of MMP-8 and MMP-9 decreased. Considering that TNF α is a physiological inducer of MMP-9 (Heidinger et al., 2006), the decreased amount of TNF α produced in the presence of silver-containing microcrystals may explain the reduction in MMP-9 production by the cells. Previous studies show that MMPs are involved in pathological and healing processes in the oral environment and are strongly related to periodontal disease, leading to the loss of periodontal attachment and bone destruction (Sorsa et al., 2006; Franco et al., 2017). Among the 23 types of MMPs already identified, the up-regulation of MMP-8 and -9 has been related to periodontitis and peri-implantitis (Franco et al., 2017), and

other studies reported that these two MMPs were associated with disease progression and bone loss (Ingman et al., 1996; Arakawa et al., 2012). High levels of MMP-8 and -9 are found in periodontal tissues where the disease is established, possibly indicating severity and progression of the pathology (Franco et al., 2017). Furthermore, MMP-8 is related to bone loss in patients with severe peri-implantitis (Arakawa et al., 2012). Hashimoto et al. (2016) evaluated cytotoxicity, genotoxicity, and MMP production of gold and platinum nanoparticles on human cells, as well as the effect of these nanoparticles on dental resin properties (Hashimoto et al., 2016). The authors showed that gold nanoparticles inhibited MMP without causing cell damage, which is an interesting property considering that MMP production can contribute to the failure of dental restorations (Hashimoto et al., 2016). Thus, therapies that affect MMP-8 and MMP-9 production by decreasing their amount could be successful in preventing peri-implant disease. The favorable biological responses of the α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ microcrystals in the present investigation, along with studies that show their antimicrobial properties, suggest that these microcrystals are promising candidates to be used as a coating material for dental and medical devices.

5. Conclusion

In conclusion, α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ induced low cytotoxicity to THP-1 and macrophages cells during a long enough period to measure potential damage. Also, these microcrystals increased the production of O₂⁻ and modulated cytokines and MMP production in a cell phenotype-dependent way. The data presented suggest that α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ are promising silver-containing microcrystals for future applications in the medical field.

Acknowledgments

This study was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) [grant number 2013/07296-2 (CDMF)]. Bruna Natália Alves da Silva Pimentel would also like to thank the financial support by FAPESP [grant number 2018/01677-8].

References

- Abdulkhaleq, L. A., M. A. Assi, Rasedee Abdullah, M. Zamri-Saad, Y. H. Taufiq-Yap, and M. N.M. Hezmee. 2018. "The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: a review." *Veterinary World* 11 (5): 627–35. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.627-635>.
- Afewerki, Samson, Nicole Bassous, Samarah Harb, Carlos Palo-Nieto, Guillermo U. Ruiz-Esparza, Fernanda R. Marciano, Thomas J. Webster, André Sales Aguiar Furtado, and Anderson O. Lobo. 2020. "Advances in dual functional antimicrobial and osteoinductive biomaterials for orthopaedic applications." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 24: 102143. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102143>.
- Akter, Mahmuda, Md Tajuddin Sikder, Md Mostafizur Rahman, A. K.M.Atiq Ullah, Kaniz Fatima Binte Hossain, Subrata Banik, Toshiyuki Hosokawa, Takeshi Saito, and Masaaki Kurasaki. 2018. "A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: physicochemical properties and perspectives." *Journal of Advanced Research* 9: 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.008>.
- Arakawa, Hikaru, Junji Uehara, Emilio Satoshi Hara, Wataru Sonoyama, Aya Kimura, Manabu Kanyama, Yoshizo Matsuka, and Takuo Kuboki. 2012. "Matrix metalloproteinase-8 is the major potential collagenase in active peri-implantitis." *Journal of Prosthodontic Research* 56 (4): 249–55. <https://doi.org/10.1016/j.jpor.2012.07.002>.
- Araújo, Rosangela Vidal de Souza, Flávio Oliveira Silva, Mário Ribeiro Melo-Júnior, and Ana Lúcia Figueiredo Porto. 2011. "Metaloproteinasas: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização." *Revista de Ciências Médicas e Biológicas* 10 (1): 82–88. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v10i1.5470>.

- Aruoma, Okezie I., Barry Halliwell, Brigid M. Hoey, and John Butler. 1989. "The antioxidant action of n-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid." *Free Radical Biology and Medicine* 6 (6): 593–97. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90066-X](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90066-X).
- Assis, M., T. Robeldo, C. C. Foggi, A. M. Kubo, G. Mínguez-Vega, E. Condoncillo, H. Beltran-Mir, et al. 2019. "Ag nanoparticles/ α -Ag₂WO₄ composite formed by electron beam and femtosecond irradiation as potent antifungal and antitumor agents." *Scientific Reports* 9 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46159-y>.
- Assis, Marcelo, Eloisa Cordoncillo, Rafael Torres-Mendieta, Héctor Beltrán-Mir, Gladys Mínguez-Vega, Regiane Oliveira, Edson R. Leite, et al. 2018. "Towards the scale-up of the formation of nanoparticles on α -Ag₂WO₄ with bactericidal properties by femtosecond laser irradiation." *Scientific Reports* 8 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19270-9>.
- Avila, Maria, David M. Ojcius, and Özlem Yilmaz. 2009. "The oral microbiota: living with a permanent guest." *DNA and Cell Biology* 28 (8): 405–11. <https://doi.org/10.1089/dna.2009.0874>.
- Benrahmoune, Mustapha, Patrice Thérond, and Zohreh Abedinzadeh. 2000. "The reaction of superoxide radical with n-acetylcysteine." *Free Radical Biology and Medicine* 29 (8): 775–82. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00380-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00380-4).
- Bradford, Marion M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical Biochemistry* 72: 248–54.
- Caldeira, François Isnaldo Dias, Jéssica de Andrade Moreno, Kellen Cristina da Silva Gasque, and Marcela Filié Haddad. 2021. "Epidemiological factors associated with *candida albicans* in patients using complete denture: a scoping review." *Revista Ciências Em Saúde* 11 (1): 31–43. <https://doi.org/10.21876/rcshci.v11i1.1050>.

- Carlson, C., S. M. Hussein, A. M. Schrand, L. K. Braydich-Stolle, K. L. Hess, R. L. Jones, and J. J. Schlager. 2008. "Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species." *Journal of Physical Chemistry B* 112 (43): 13608–19. <https://doi.org/10.1021/jp712087m>.
- Castro, Denise T. De, Mariana L.C. Valente, José Augusto M. Agnelli, Cláudia H. Lovato Da Silva, Evandro Watanabe, Renato L. Siqueira, Oswaldo L. Alves, Raphael D. Holtz, and Andréa C. Dos Reis. 2016. "In vitro study of the antibacterial properties and impact strength of dental acrylic resins modified with a nanomaterial." *Journal of Prosthetic Dentistry* 115 (2): 238–46. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2015.09.003>.
- Castro, Denise T. De, Mariana L.C. Valente, Cláudia H.L. Da Silva, Evandro Watanabe, Renato L. Siqueira, Marco A. Schiavon, Oswaldo Luiz Alves, and Andréa C. Dos Reis. 2016. "Evaluation of antibiofilm and mechanical properties of new nanocomposites based on acrylic resins and silver vanadate nanoparticles." *Archives of Oral Biology* 67: 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.03.002>.
- Castro, Denise Tornavoi de, Raphael Dias Holtz, Oswaldo Luiz Alves, Evandro Watanabe, Mariana Lima de Costa Valente, Cláudia Helena Lovato da Silva, and Andréa Cândido dos Reis. 2014. "Development of a novel resin with antimicrobial properties for dental application." *Journal of Applied Oral Science* 22 (5): 442–49. <https://doi.org/10.1590/1678-775720130539>.
- Chernousova, Svitlana, and Matthias Epple. 2013. "silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal." *Angewandte Chemie - International Edition* 52 (6): 1636–53. <https://doi.org/10.1002/anie.201205923>.
- Dizaj, Solmaz Maleki, Farzaneh Lotfipour, Mohammad Barzegar-Jalali, Mohammad Hossein Zarrintan, and Khosro Adibkia. 2014. "Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles." *Materials Science and Engineering C* 44: 278–84. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.08.031>.

- Fabbro, Maria T., Camila C. Foggi, Luis P.S. Santos, Lourdes Gracia, André Perrin, Christiane Perrin, Carlos E. Vergani, et al. 2016. "Synthesis, antifungal evaluation and optical properties of silver molybdate microcrystals in different solvents: a combined experimental and theoretical study." *Dalton Transactions* 45 (26): 10736–43. <https://doi.org/10.1039/c6dt00343e>.
- Florea, Denisa Alexandra, Delia Albuleț, Alexandru Mihai Grumezescu, and Ecaterina Andronescu. 2020. "Surface modification – a step forward to overcome the current challenges in orthopedic industry and to obtain an improved osseointegration and antimicrobial properties." *Materials Chemistry and Physics* 243 (August 2019): 122579. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.122579>.
- Foggi, Camila C. De, Regiane C. De Oliveira, Maria T. Fabbro, Carlos E. Vergani, Juan Andres, Elson Longo, and Ana L. Machado. 2017. "Tuning the morphological, optical, and antimicrobial properties of α -Ag₂WO₄ microcrystals using different solvents." *Crystal Growth and Design* 17 (12): 6239–46. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b00786>.
- Foggi, Camila C., Maria T. Fabbro, Luís P.S. Santos, Yuri V.B. de Santana, Carlos E. Vergani, Ana L. Machado, Eloisa Cordoncillo, Juan Andrés, and Elson Longo. 2017a. "Synthesis and evaluation of α -Ag₂WO₄ as novel antifungal agent." *Chemical Physics Letters* 674: 125–29. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2017.02.067>.
- Foggi, Camila Cristina de, Regiane Cristina de Oliveira, Marcelo Assis, Maria Tereza Fabbro, Valmor Roberto Mastelaro, Carlos Eduardo Vergani, Lourdes Gracia, Juan Andrés, Elson Longo, and Ana Lucia Machado. 2020. "Unveiling the role of β -Ag₂MoO₄ microcrystals to the improvement of antibacterial activity." *Materials Science and Engineering C* 111 (January): 110765. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110765>.

- Foldbjerg, Rasmus, Duy Anh Dang, and Herman Autrup. 2011. "Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549." *Archives of Toxicology* 85 (7): 743–50. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0545-5>.
- Foldbjerg, Rasmus, Ping Olesen, Mads Hougaard, Duy Anh Dang, Hans Jürgen Hoffmann, and Herman Autrup. 2009. "PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes." *Toxicology Letters* 190 (2): 156–62. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.009>.
- Franco, Cavalla, Hernández Rios Patricia, Sorsa Timo, Bigueti Claudia, and Hernández Marcela. 2017. "Matrix metalloproteinases as regulators of periodontal inflammation." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (2): 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijms18020440>.
- Haro Chávez, Natali Lisette, Erica Dorigatti de Avila, Paula Aboud Barbugli, Regiane Cristina de Oliveira, Camila Cristina de Foggi, Elson Longo, and Carlos Eduardo Vergani. 2018. "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 and Surfaces B: Biointerfaces* 170 (May): 505–13. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.023>.
- Hashimoto, Masanori, Koji Kawai, Hayato Kawakami, and Satoshi Imazato. 2016. "Matrix metalloproteases inhibition and biocompatibility of gold and platinum nanoparticles." *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 104 (1): 209–17. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35557>.
- Heidinger, Michael, Helmut Kolb, Hans Willi Krell, Marianne Jochum, and Christian Ries. 2006. "Modulation of autocrine TNF- α -stimulated matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression by Mitogen-Activated Protein Kinases in THP-1 monocytic cells." *Biological Chemistry* 387 (1): 69–78. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.010>.

- Hogan, Siobhan, Emmanouil Kasotakis, Sean Maher, Brenton Cavanagh, James P. O’Gara, Abhay Pandit, Tia E. Keyes, Marc Devocelle, and Eoghan O’Neill. 2019. “A novel medical device coating prevents *Staphylococcus aureus* biofilm formation on medical device surfaces.” *FEMS Microbiology Letters* 366 (9): 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz107>.
- Ingman, Tuula, Taina Tervahartiala, Yanli Ding, Harald Tschesche, Ahmad Haerian, Denis F. Kinane, Yrkö T. Kontinen, and Timo Sorsa. 1996. “Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients.” *Journal of Clinical Periodontology* 23 (12): 1127–32. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1996.tb01814.x>.
- Kim, Keuk Jun, Woo Sang Sung, Bo Kyoung Suh, Seok Ki Moon, Jong Soo Choi, Jong Guk Kim, and Dong Gun Lee. 2009. “Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*.” *BioMetals* 22 (2): 235–42. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9159-2>.
- KIR, Seher, and Buğra Kaan BAHCECİ. 2020. “Evaluation of the prognostic factors for candidemia in a medical intensive care unit.” *Journal of Surgery and Medicine* 4 (10): 870–74. <https://doi.org/10.28982/josam.804426>.
- Kumar, V, AK Abbas, and JC Aster. 2013. “Inflamação e Reparo.” In *Robbins Patologia Básica*, 9th ed., 29–73. Rio de Janeiro: Elsevier.
- Liu, Wei, Yuan Wu, Chang Wang, Hong C. Li, Thanh Wang, Chun Y. Liao, Lin Cui, Qun F. Zhou, Bing Yan, and Gui B. Jiang. 2010. “Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size.” *Nanotoxicology* 4 (3): 319–30. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.483745>.
- Longo, Valéria M., Camila C. De Foggi, Mateus M. Ferrer, Amanda F. Gouveia, Rafaela S. André, Waldir Avansi, Carlos E. Vergani, et al. 2014. “Potentiated electron transference in α -Ag₂WO₄ microcrystals with ag nanofilaments as microbial agent.” *Journal of Physical Chemistry A* 118 (31): 5769–78. <https://doi.org/10.1021/jp410564p>.

- Lönnroth, Emma Christin, and Jon Einar Dahl. 2001. "Cytotoxicity of dental glass ionomers evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests." *Acta Odontologica Scandinavica* 59 (1): 34–39. <https://doi.org/10.1080/000163501300035760>.
- Lönnroth, Emma Christin, and Jon Einar Dahl. 2003. "Cytotoxicity of liquids and powders of chemically different dental materials evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests." *Acta Odontologica Scandinavica* 61 (1): 52–56. <https://doi.org/10.1080/ode.61.1.52.56>.
- Martinez-Gutierrez, Fidel, Laura Boegli, Alessandra Agostinho, Elpidio Morales Sánchez, Horacio Bach, Facundo Ruiz, and Garth James. 2013. "Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms." *Biofouling* 29 (6): 651–60. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.794225>.
- Martínez-Gutierrez, Fidel, Emily P. Thi, Judith M. Silverman, Carolina Camargo de Oliveira, Sarah L. Svensson, Amanda Vanden Hoek, Elpidio Morales Sánchez, et al. 2012. "Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 8 (3): 328–36. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.06.014>.
- Murphy, A., A. Casey, G. Byrne, G. Chambers, and O. Howe. 2016. "Silver nanoparticles induce pro-inflammatory gene expression and inflammasome activation in human monocytes." *Journal of Applied Toxicology* 36 (10): 1311–20. <https://doi.org/10.1002/jat.3315>.
- Ndengele, Michael M., Carolina Muscoli, Zhi Qiang Wang, Timothy M. Doyle, George M. Matuschak, and Daniela Salvemini. 2005. "Superoxide potentiates NF- κ B activation and modulates endotoxin-induced cytokine production in alveolar macrophages." *Shock* 23 (2): 186–93. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000144130.36771.d6>.

- Nishanth, Reddy P., Radhika G. Jyotsna, John J. Schlager, Saber M. Hussain, and Pallu Reddanna. 2011. "Inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages upon exposure to nanoparticles: role of ROS-NF- κ B signaling pathway." *Nanotoxicology* 5 (4): 502–16. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.541604>.
- Oliveira, Regiane Cristina De, Camila Cristina De Foggi, Mayara Mondego Teixeira, Maya Dayana Penha Da Silva, Marcelo Assis, Eric Mark Francisco, Bruna Natalia Alves Da Silva Pimentel, et al. 2017. "Mechanism of antibacterial activity via morphology change of α -AgVO₃: theoretical and experimental insights." *ACS Applied Materials and Interfaces* 9 (13): 11472–81. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b00920>.
- Panáček, Aleš, Milan Kolář, Renata Večeřová, Robert Prucek, Jana Soukupová, Vladimír Kryštof, Petr Hamal, Radek Zbořil, and Libor Kvítek. 2009. "Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp." *Biomaterials* 30 (31): 6333–40. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.065>.
- Park, E. K., H. S. Jung, H. I. Yang, M. C. Yoo, C. Kim, and K. S. Kim. 2007. "Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli." *Inflammation Research* 56 (1): 45–50. <https://doi.org/10.1007/s00011-007-6115-5>.
- Park, Margriet V.D.Z., Arianne M. Neigh, Jolanda P. Vermeulen, Liset J.J. de la Fonteyne, Henny W. Verharen, Jacob J. Briedé, Henk van Loveren, and Wim H. de Jong. 2011. "The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles." *Biomaterials* 32 (36): 9810–17. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.085>.
- Parks, William C., Carole L. Wilson, and Yolanda S. López-Boado. 2004. "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity." *Nature Reviews Immunology* 4 (8): 617–29. <https://doi.org/10.1038/nri1418>.

- Pimentel, Bruna Natália Alves da Silva, Camila Cristina de Foggi, Paula Aboud Barbugli, Regiane Cristina de Oliveira, Erica Dorigatti de Avila, Elson Longo, and Carlos Eduardo Vergani. 2020. "Antifungal activity and biocompatibility of α -AgVO₃ microcrystals: a promising material against oral *Candida* disease." *Materials Science and Engineering C* 108 (November 2019): 110405. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110405>.
- Politano, Amani D., Kristin T. Campbell, Laura H. Rosenberger, and Robert G. Sawyer. 2013. "Use of silver in the prevention and treatment of infections: silver review." *Surgical Infections* 14 (1): 8–20. <https://doi.org/10.1089/sur.2011.097>.
- Rangel, André L.R., Céline Falentin-Daudré, Bruna Natália Alves da Silva Pimentel, Carlos Eduardo Vergani, Véronique Migonney, and Ana P.R. Alves Claro. 2020. "Nanostructured titanium alloy surfaces for enhanced osteoblast response: a combination of morphology and chemistry." *Surface and Coatings Technology* 383 (November 2019): 125226. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.125226>.
- Salerno, Carmen, Michelangelo Pascale, María Contaldo, Vincenzo Esposito, Maurizio Busciolano, Lucio Milillo, Agostino Guida, Massimo Petruzzi, and Rosario Serpico. 2011. "*Candida*-associated denture stomatitis." *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* 16 (2): e139–43. <https://doi.org/10.4317/medoral.16.e139>.
- Schieber, Michael, and Navdeep S. Chandel. 2014. "ROS function in redox signaling and oxidative stress." *Current Biology* 24 (10): R453–62. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>.
- Shang, Bin, Miao Xu, Zelun Zhi, Yuewei Xi, Yanbing Wang, Bo Peng, Peng Li, and Ziwei Deng. 2019. "Synthesis of sandwich-structured silver@polydopamine@silver shells with enhanced antibacterial activities." *Journal of Colloid and Interface Science* 558: 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.09.091>.

- Shapiro, R. S., N. Robbins, and L. E. Cowen. 2011. "Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75 (2): 213–67. <https://doi.org/10.1128/membr.00045-10>.
- Shirtliff, Mark E., Brian M. Peters, and Mary Ann Jabra-Rizk. 2009. "Cross-kingdom interaction: *Candida albicans* and bacteria." *FEMS Microbial Lett* 299 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1126/science.1249098>.Sleep.
- Sletten, Gaynour B.G., and Jon E. Dahl. 1999. "Cytotoxic effects of extracts of compomers." *Acta Odontologica Scandinavica* 57 (6): 316–22. <https://doi.org/10.1080/000163599428544>.
- Sorsa, Timo, Leo Tjäderhane, Yrjö T. Konttinen, Anneli Lauhio, Tuula Salo, Hsi Ming Lee, Lorne M. Golub, David L. Brown, and Päivi Mäntylä. 2006. "Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation." *Annals of Medicine* 38 (5): 306–21. <https://doi.org/10.1080/07853890600800103>.
- Sudbery, Peter, Neil Gow, and Judith Berman. 2004. "The distinct morphogenic states of *Candida albicans*." *Trends in Microbiology* 12 (7): 317–24. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.05.008>.
- Tran, Phong A., and Thomas J. Webster. 2013. "Antimicrobial selenium nanoparticle coatings on polymeric medical devices." *Nanotechnology* 24 (15). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/15/155101>.
- Turner, Mark D., Belinda Nedjai, Tara Hurst, and Daniel J. Pennington. 2014. "Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1843 (11): 2563–82. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>.

- Verza, Beatriz S., Jeroen J.J.P. van den Beucken, João V. Brandt, Miguel Jafelicci Junior, Valentim A.R. Barão, Rodolfo D. Piazza, Oya Tagit, Denise M.P. Spolidorio, Carlos Eduardo Vergani, and Erica D. de Avila. 2021. "A long-term controlled drug-delivery with anionic beta cyclodextrin complex in layer-by-layer coating for percutaneous implants devices." *Carbohydrate Polymers* 257 (January). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117604>.
- Zhu, Hailin, Chao Hu, Fangfang Zhang, Xinxing Feng, Jiuming Li, Tao Liu, Jianyong Chen, and Jianchun Zhang. 2014. "Preparation and antibacterial property of silver-containing mesoporous 58s bioactive glass." *Materials Science and Engineering C* 42: 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.004>.

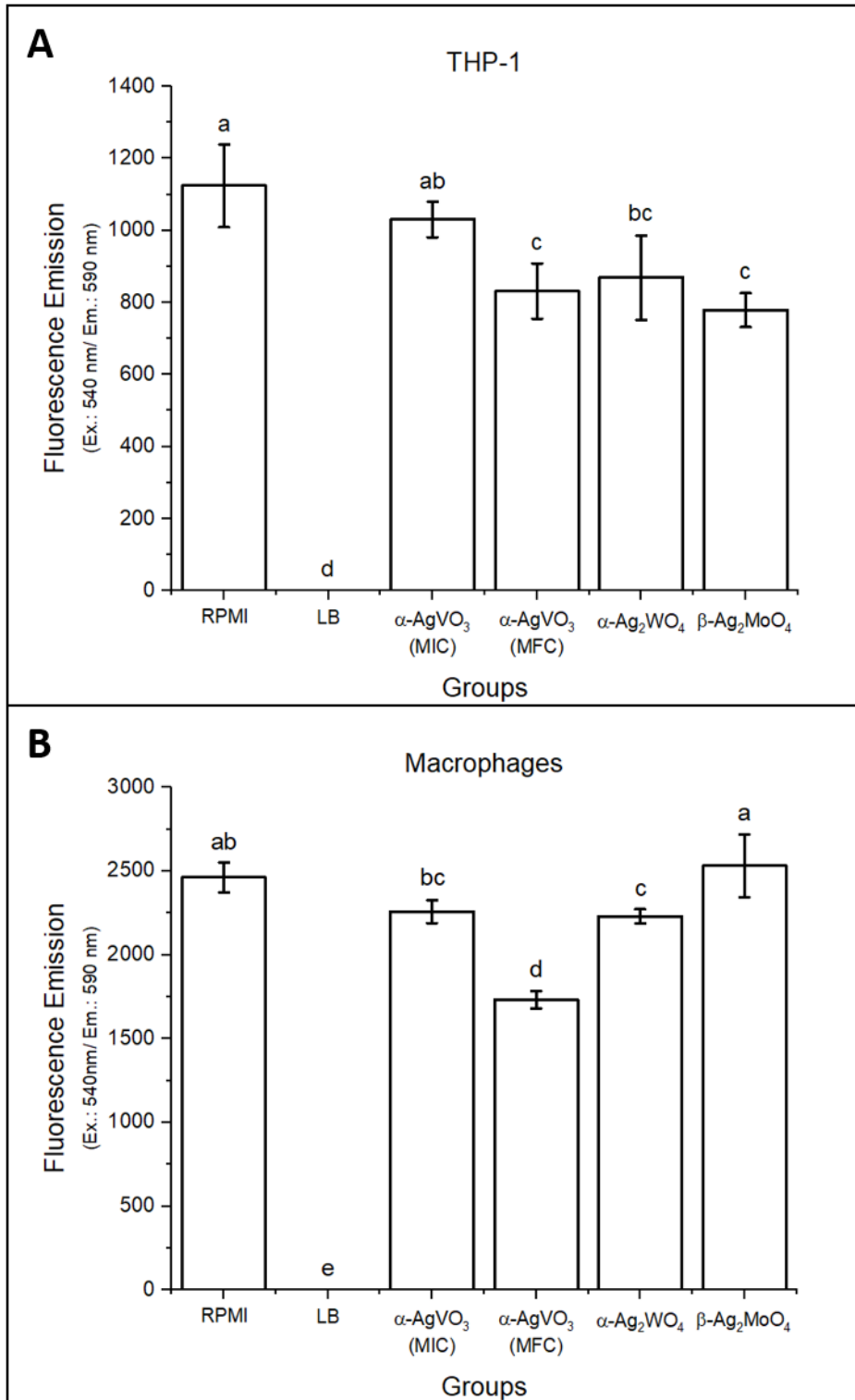


Figure 1. Mean values of fluorescence emission of **(A)** THP-1 cells and **(B)** macrophages after contact with α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ microcrystals for 24 hours. RPMI: standard cell culture conditions control; LB: lysis buffer cell death control; MIC: minimal inhibitory concentration; MFC: minimal fungicidal concentration. Different letters represent a statistically significant difference between groups.

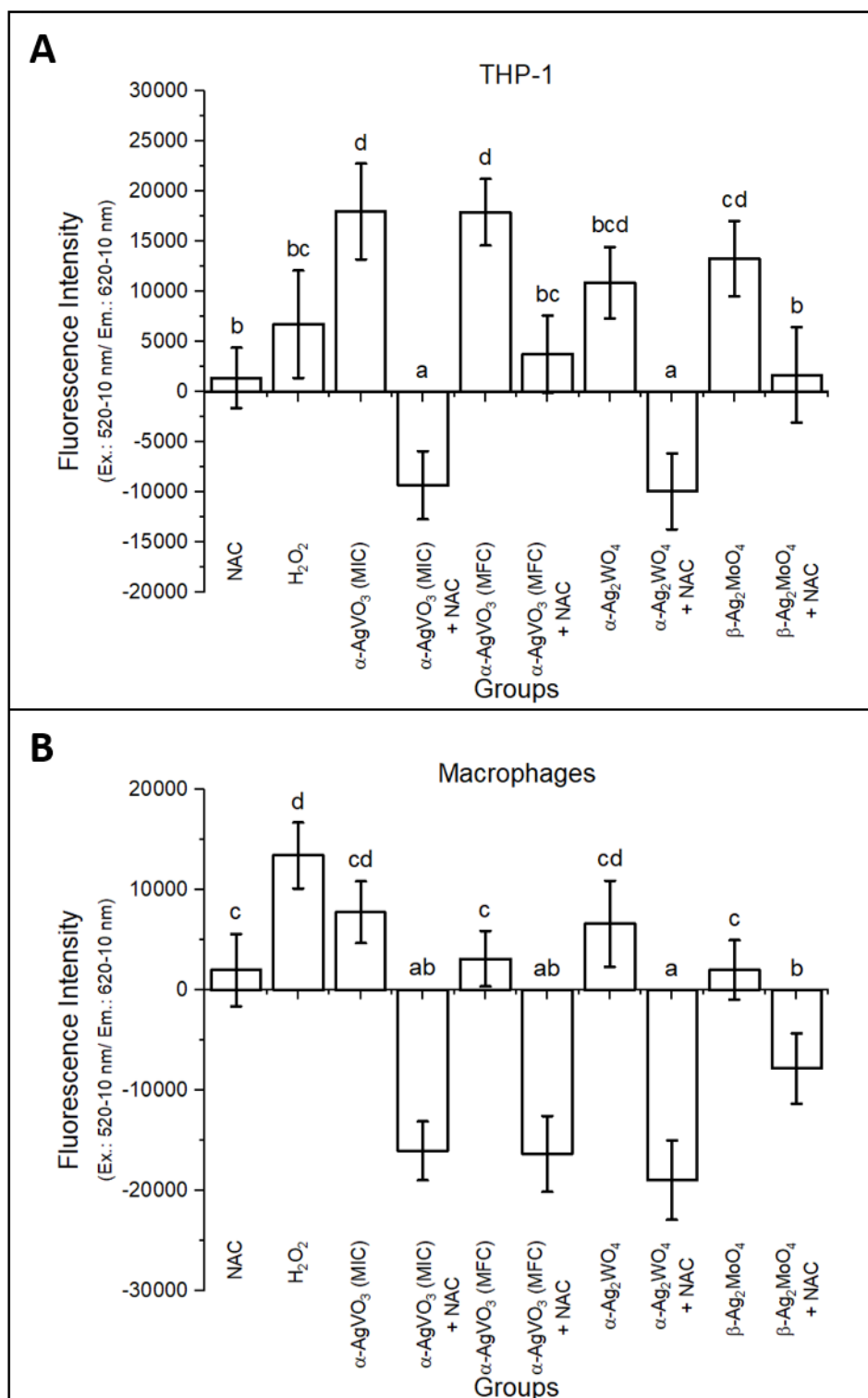


Figure 2. Mean values of fluorescence intensity of THP-1 **(A)** and macrophages **(B)** using DHE probe after contact with NAC [0.01 mM], H₂O₂ [0.125 mM], and α-AgVO₃, α-Ag₂WO₄, and β-Ag₂MoO₄ microcrystals (alone or with NAC). Error bars: standard deviation. NAC: N-Acetyl-L-cysteine; H₂O₂: hydrogen peroxide; MIC: minimal inhibitory concentration; MFC: minimal fungicidal concentration. Different letters represent a statistically significant difference between groups.

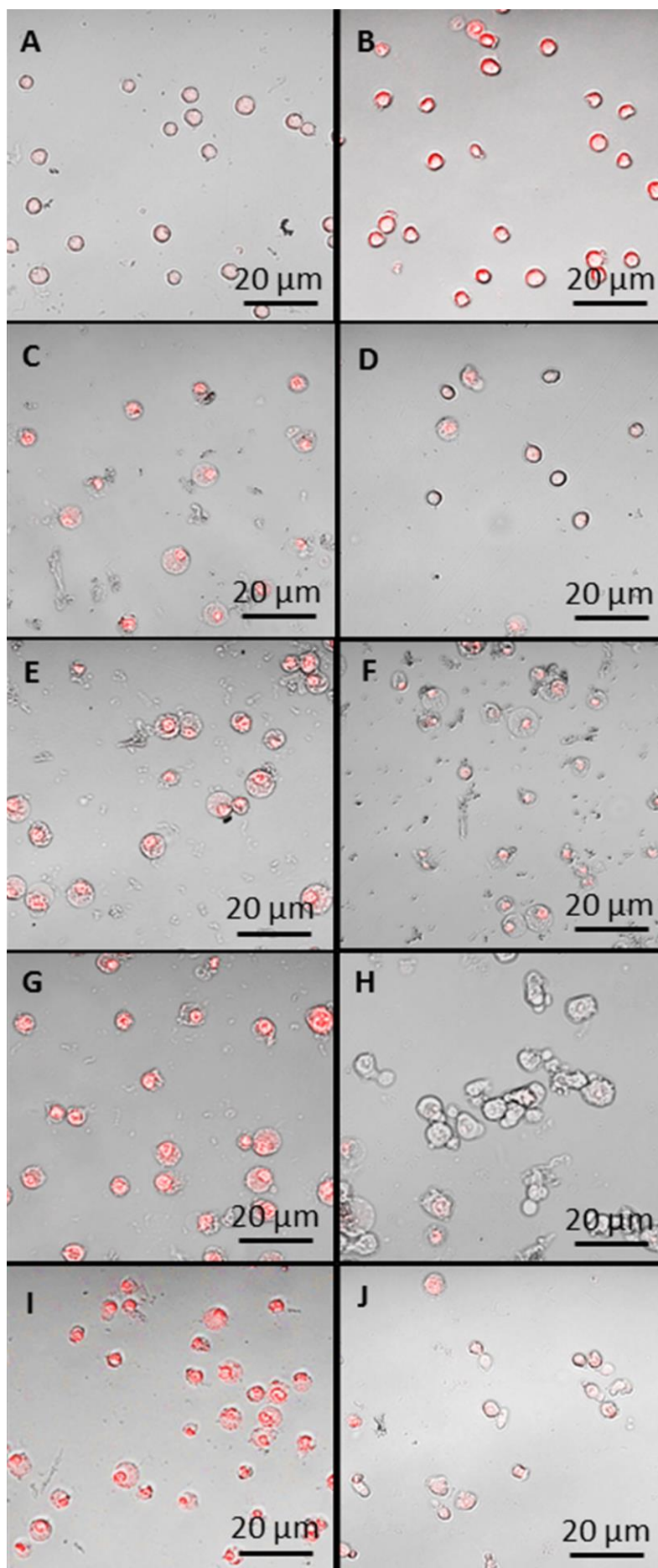


Figure 3. CLSM of THP-1 cells. **(A)** standard culture conditions; **(B)** H_2O_2 [0.125 mM]; C and D: $\alpha\text{-AgVO}_3$ MIC [3.9 $\mu\text{g/mL}$] without NAC **(C)** and with NAC [0.01 mM] **(D)**; E and F: $\alpha\text{-AgVO}_3$ MFC [15.62 $\mu\text{g/mL}$] without NAC **(E)** and with NAC [0.01 mM] **(F)**; G and H: $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ [7.81 $\mu\text{g/mL}$] without NAC **(G)** and with NAC [0.01 mM] **(H)**; I and J: $\alpha\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ [15.62 $\mu\text{g/mL}$] without NAC **(I)** and with NAC [0.01 mM] **(J)**. Red fluorescence: O_2^- production.

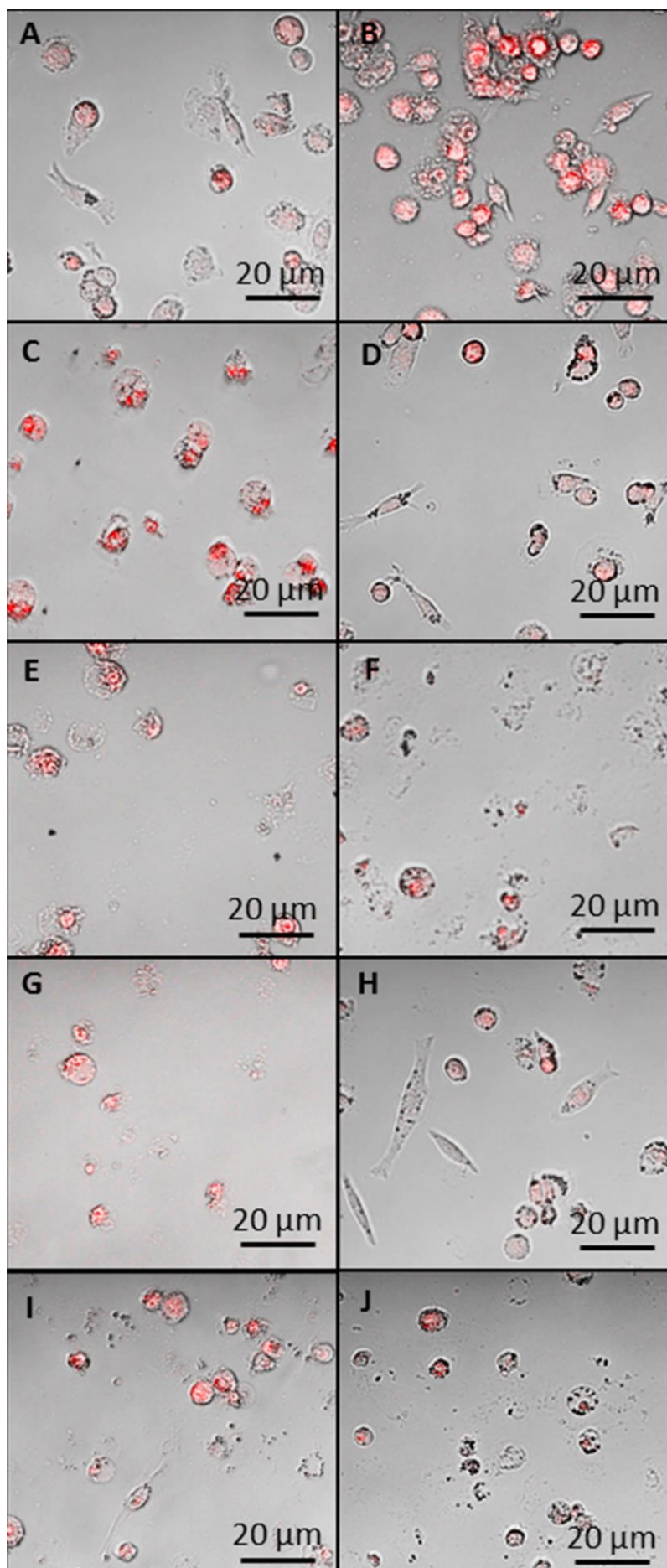


Figure 4. CLSM of macrophage cells. **(A)** standard culture conditions; **(B)** H_2O_2 [0.125 mM]; C and D: $\alpha\text{-AgVO}_3$ MIC [3.9 $\mu\text{g/mL}$] without NAC **(C)** and with NAC [0.01 mM] **(D)**; E and F: $\alpha\text{-AgVO}_3$ MFC [15.62 $\mu\text{g/mL}$] without NAC **(E)** and with NAC [0.01 mM] **(F)**; G and H: $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ [7.81 $\mu\text{g/mL}$] without NAC **(G)** and with NAC [0.01 mM] **(H)**; I and J: $\alpha\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ [15.62 $\mu\text{g/mL}$] without NAC **(I)** and with NAC [0.01 mM] **(J)**. Red fluorescence: O_2^- production.

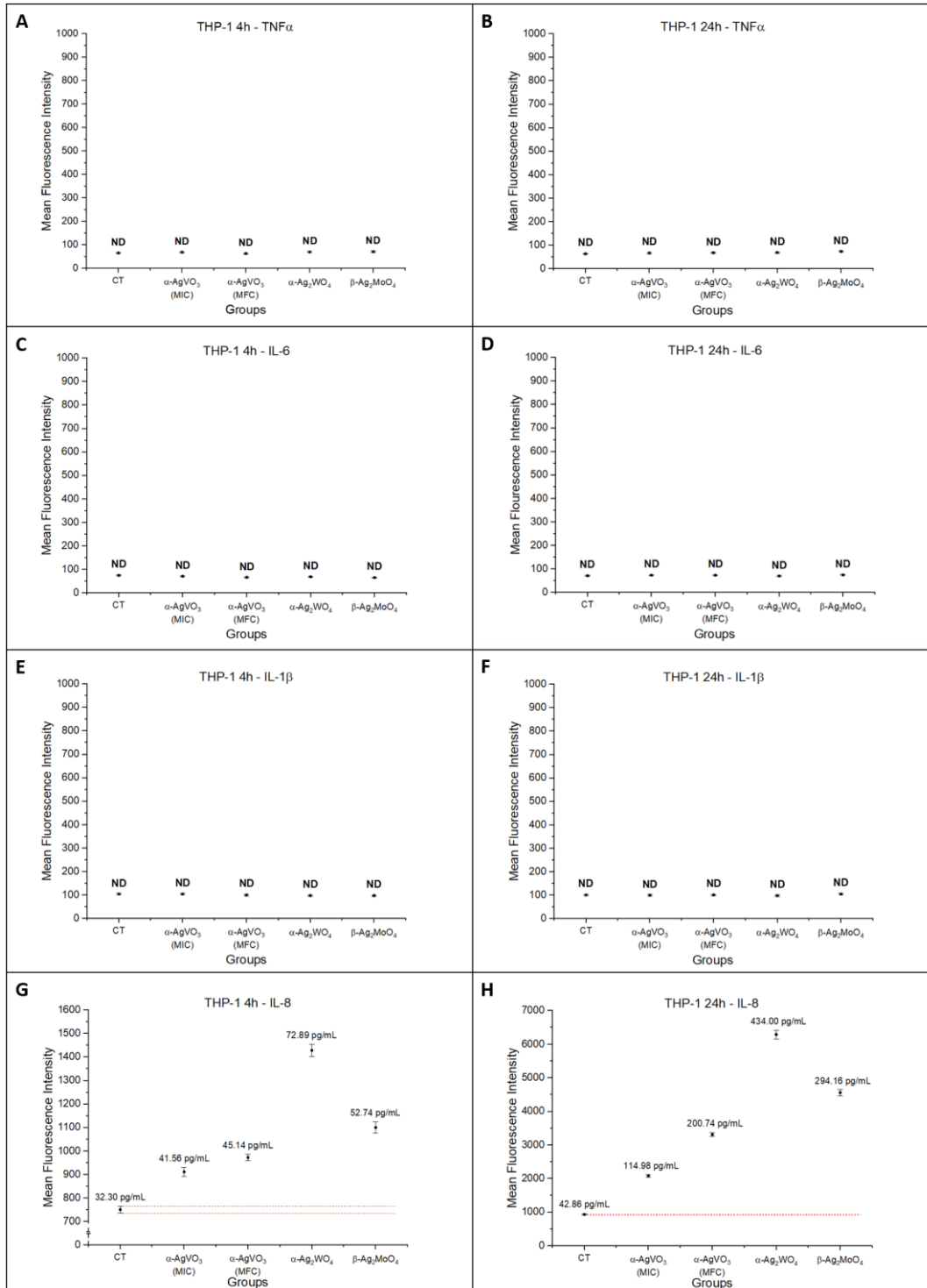


Figure 5. Mean fluorescence intensity and its respective confidence interval (95% CI) of TNF α , IL-6, IL-1 β , and IL-8 by THP-1 cells after 4 hours (**A, C, E, G**) and 24 hours (**B, D, F, H**) of THP-1 cells after contact with α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ microcrystals. Dot: mean fluorescence intensity; Error bars: 95% CI; CT: control; MIC: minimal inhibitory concentration; MFC: minimal fungicidal concentration; ND: non-detected. The dotted lines indicate the upper and lower limits of the 95% CI of the CT group. Amount of cytokine produced (pg/mL) above each 95% CI.

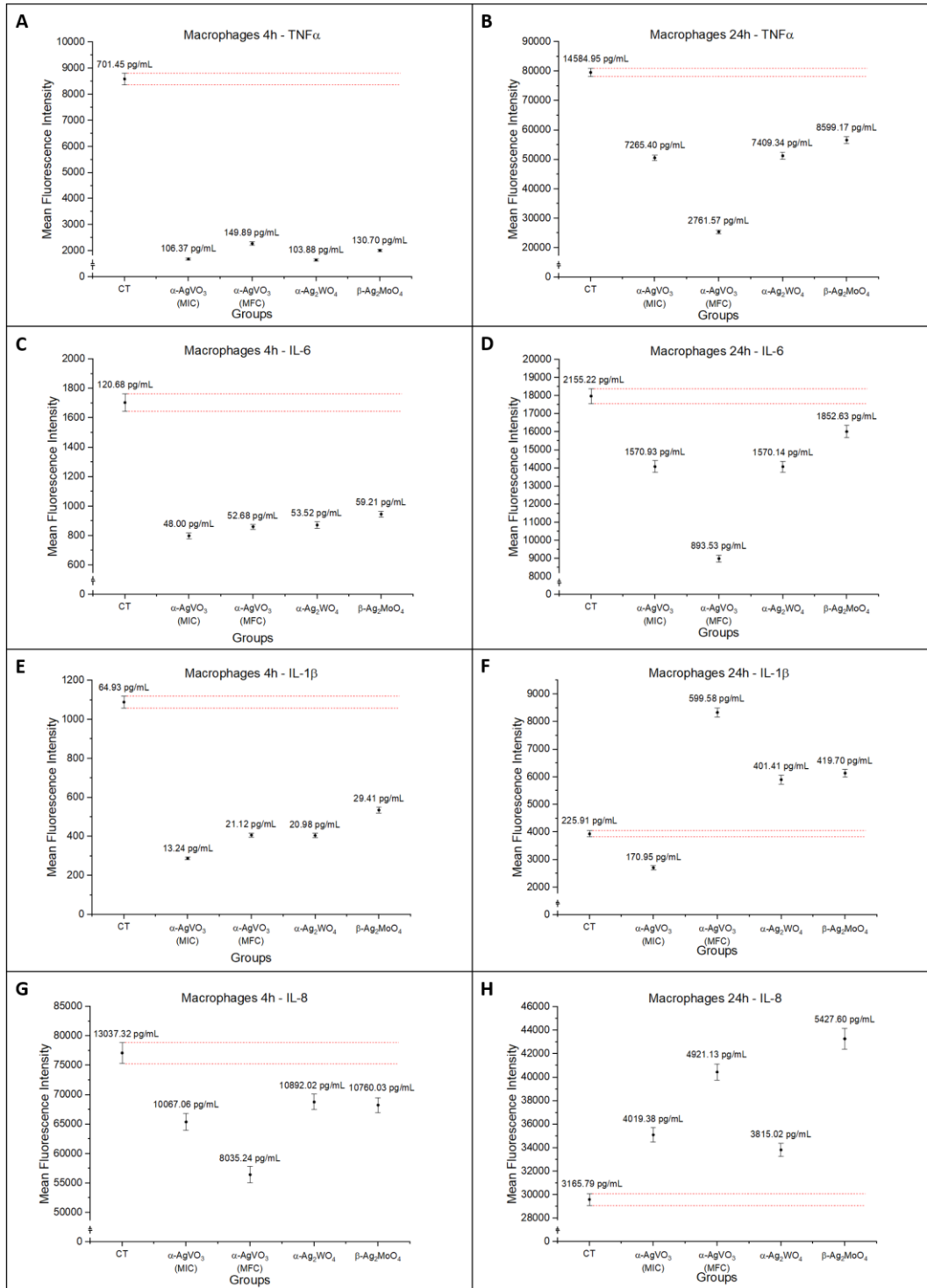


Figure 6. Mean fluorescence intensity and its respective confidence interval (95% CI) of IL-1 β , TNF α , IL-6, and IL-8 by macrophages cells after 4 hours (**A, C, E, G**) and 24 hours (**B, D, F, H**) after contact with α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ microcrystals. Dot: mean fluorescence intensity; Error bars: 95% CI; CT: control; MIC: minimal inhibitory concentration; MFC: minimal fungicidal concentration. The dotted lines indicate the upper and lower limits of the 95% CI of the CT group. Amount of cytokine produced (pg/mL) above each 95% CI.

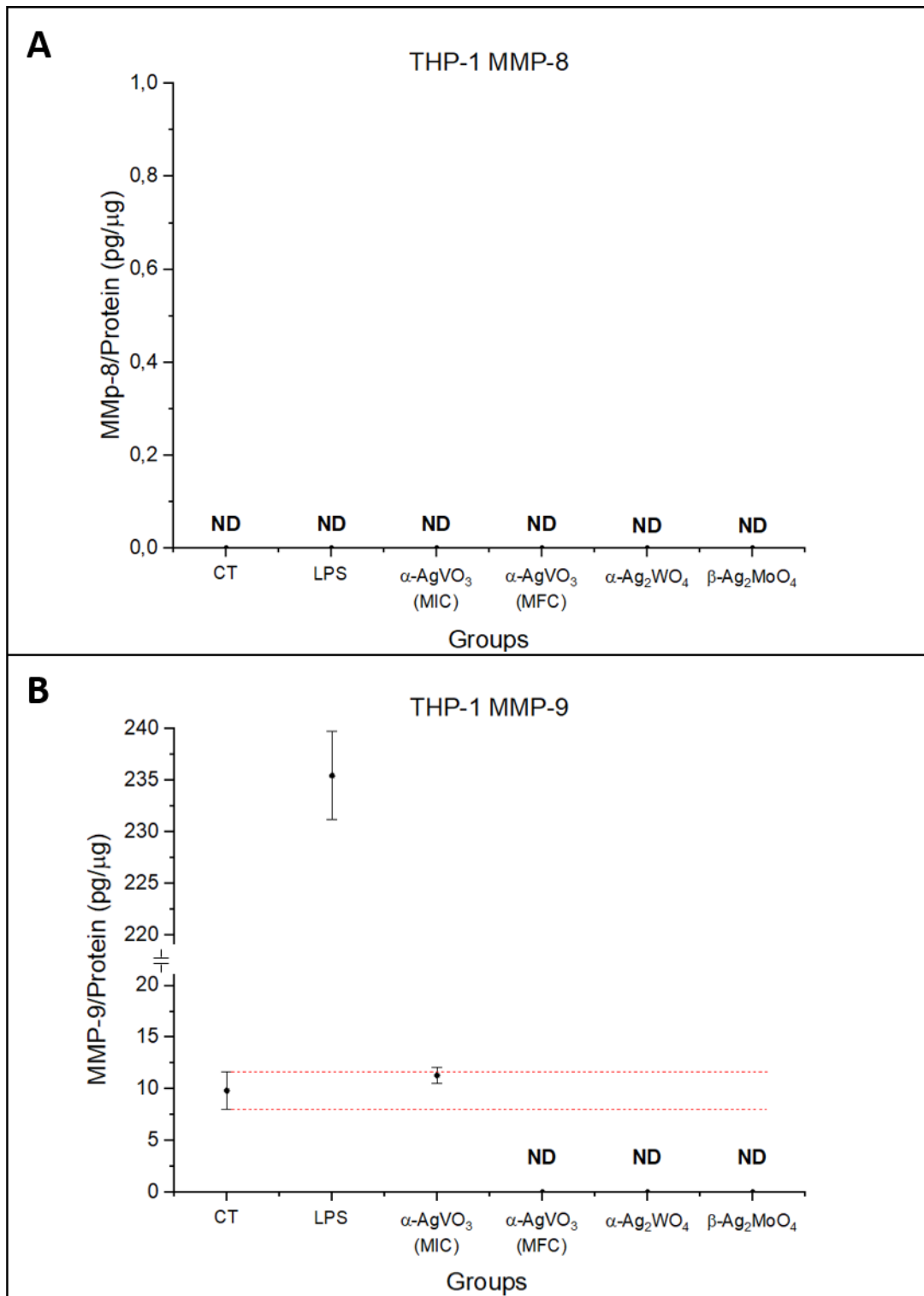


Figure 7. A 95% confidence interval (mean value $\pm$ standard error) of MMP-8 (**A**) and -9 (**B**) (pg of MMP/ μ g of total protein) released by THP-1 cells after 24 hours of contact with α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ microcrystals. CT: standard culture conditions; LPS: positive control; MIC: minimal inhibitory concentration; MFC: minimal fungicidal concentration; ND: non-detected. The dotted lines indicate the upper and lower limits of the 95% CI of the CT group.

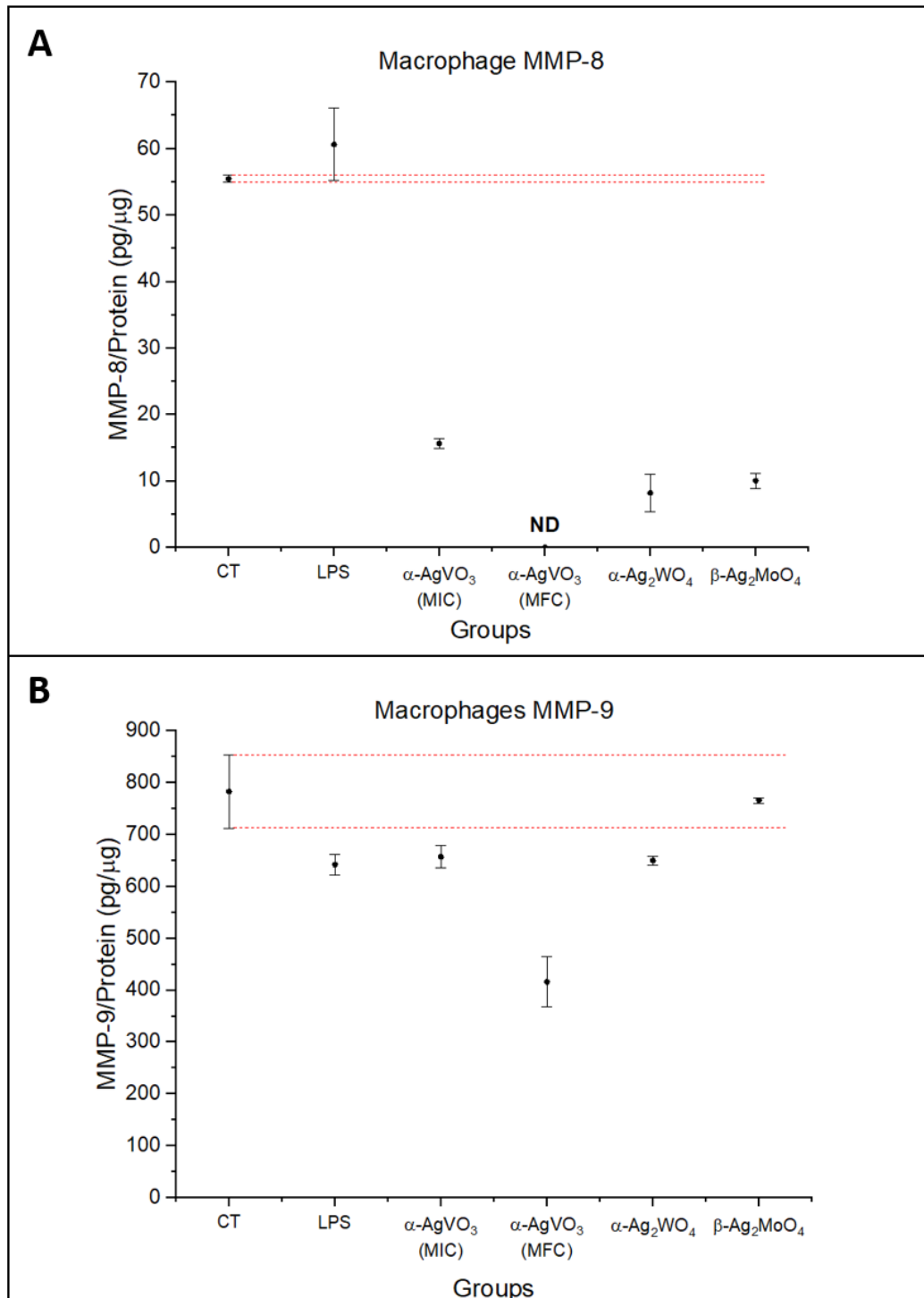


Figure 8. A 95% confidence interval (mean value $\pm$ standard error) of MMP-8 **(A)** and -9 **(B)** (pg of MMP/ μ g of protein) released by macrophages cells after 24 hours of contact with α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ microcrystals. CT: standard culture conditions; LPS: positive control; MIC: minimal inhibitory concentration; MFC: minimal fungicidal concentration. The dotted lines indicate the upper and lower limits of the 95% CI of the CT group.

3.2 Publicação 2*

Antifungal activity and biocompatibility of α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ using a 3D co-culture model of the oral mucosa

Running title: Antifungal and biocompatibility of Ag-microcrystals

Bruna Natália Alves da Silva Pimentel¹, Freddy Humberto Marin-Dett², Marcelo Assis³, Paula Aboud Barbugli^{1,2}, Elson Longo³, Carlos Eduardo Vergani^{1*}

¹Laboratory of Applied Microbiology, School of Dentistry, Department of Dental Materials and Prosthodontics, São Paulo State University (Unesp), Araraquara, Brazil,

²School of Pharmaceutical Sciences, Department of Clinical Analysis, São Paulo State University (Unesp), Araraquara, Brazil.

³CDMF, LIEC, Chemistry Department, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brazil

*** Correspondence:**

Corresponding Author: carlos.vergani@unesp.br

Keywords: silver, microcrystals, infection, *Candida albicans*, 3D cultures, Cytokines

* Artigo submetido, aceito para publicação e formatado de acordo com o Periódico *Frontiers in Biotechnology and Bioengineering* (ANEXO A).

Abstract

Fungal infections have become a major concern in the medical community, especially those caused by *Candida spp.* Within this species, *Candida albicans* stands out for being an opportunistic commensal fungus that can cause superficial and invasive infections. Current antifungal therapy involves the local and/or systemic use of drugs such as azoles, polyenes, and echinocandins. These antifungals are based on highly specific target sites and the development of resistance may occur with changes in the enzymatic pathways which serve as the drug targets. Thus, the development of new antifungal drugs is highly recommended to prevent drug resistance. The present investigation evaluated the antifungal activity of silver-containing microcrystals such as silver vanadate (α -AgVO₃), silver tungstate (α -Ag₂WO₄), and silver molybdate (β -Ag₂MoO₄). In addition to having antimicrobial activity, such compounds should not cause damage to underlying tissues. Thus, to better assess the biocompatibility of new compounds, a new 3D co-culture model involving three cell lines was developed. The validation of the model was based on fluorescent markers and confocal laser microscopy. The biocompatibility of silver-containing microcrystals was evaluated by MTT assay. 3D co-culture was infected with *C. albicans* biofilm and challenged with α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄. The action of microcrystals on *C. albicans* biofilm was evaluated by colony forming units (CFU/mL) and live/dead staining. In addition, production of proinflammatory cytokines IL-6, IL-8, IL-1 β , and TNF α was measured by cytometric bead array (CBA) kit using the flow cytometry. The 3D co-culture model described here proved to be adequate to assess both the biocompatibility of the new materials and the infectious processes. Regarding the biocompatibility of the microcrystals, only α -AgVO₃ [15.62 μ g/mL] showed a decrease in cell viability. The anti-biofilm activity of α -Ag₂WO₄ was similar to that of the standard drug (fluconazole). Although α -Ag₂WO₄ was able to induce the production of IL-6, IL-8, and IL-1 β , no differences in cytokine production were observed between noninfected and infected models treated with this microcrystal. β -Ag₂MoO₄ inhibit the production of TNF α in the infected model, however, it showed no antibiofilm activity. Based on the biocompatibility and antifungal findings, α -Ag₂WO₄ is a promising material for treating *C. albicans* infection.

1. INTRODUCTION

Opportunistic fungal infections have been described as important causes of morbidity and mortality (Naglik et al., 2017). Among several opportunistic fungi, *C. albicans* is considered one of the most relevant, since it is responsible for a large number of fungal infections (Pellon et al., 2020). In patients with systemic fungal infections, there is a predominance of *C. albicans* in clinical isolates (58%), with the lungs being a frequent site of colonization (Xie et al., 2008; Pellon et al., 2020). The presence of *C. albicans* associated with systemic and/or local factors, such as chronic diseases, immunosuppression, dry mouth, and poor oral hygiene (Salerno et al., 2011), is related to higher rates of morbidity and mortality in these patients (Sudbery et al., 2004; Salerno et al., 2011).

The pathophysiology of *C. albicans* is closely influenced by several virulence factors such as the capacity to adhere to host tissues, the secretion of hydrolytic enzymes (proteases, phospholipases, and hemolysins), and the ability to form biofilm, a highly organized structure that protects the microorganism from environmental changes, including antifungal agents (Sardi et al., 2013). Currently, local and/or systemic antifungal therapy includes the use of several drugs to treat *C. albicans* infections, with echinocandins, polyenes and azoles being the most commonly used. These drugs act by preventing the synthesis or binding to components of the cell membrane of fungi, such as ergosterol, thus causing their death (Andriole, 2000). Despite their relatively good performance and clinical success, the prolonged use of these antifungals can cause kidney and liver damage (Andriole, 2000). In addition, the indiscriminate use of these drugs may lead to increased tolerance/resistance of microorganisms due to molecular mechanisms of protection, such as the decrease in the permeability of the membrane to the drug (Canuto and Roderio, 2002). Thus, identifying novel multitarget antifungal agents to overcome these limitations represents an urgent need in the field.

New materials that physically and/or chemically inactivate microorganisms have been widely studied, mainly because they have a low propensity to cause microbial resistance (Panáček et al., 2009; Kim et al., 2009; Lipovsky et al., 2011; Junqueira et al., 2012; Dovigo et al., 2013; Longo et al., 2014; Fabbro et al., 2016; Foggi et al., 2017a; Foggi et al., 2017b; de Oliveira et al., 2017; Hamida et al., 2020). Among these materials, the silver-containing microcrystals silver vanadate (α -AgVO₃), silver

tungstate (α -Ag₂WO₄) and silver molybdate (β -Ag₂MoO₄) have been shown to promote growth inhibition and/or death of microorganisms such as *C. albicans* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in their free (planktonic) form (Longo et al., 2014; Fabbro et al., 2016; Foggi et al., 2017a; Foggi et al., 2017b; de Oliveira et al., 2017; Assis et al., 2018; Assis et al., 2019; Pimentel et al., 2020). The proposed mechanism of action is based on theoretical calculations where, through the generation of free radicals such as hydroxyl (OH^{*}), superoxide (O₂[']), and hydroperoxyl (HO₂^{*}), important components of microorganisms such as polysaccharides, lipids, and cell membrane proteins are affected, thus altering their integrity and causing microorganism death (Longo et al., 2014; Fabbro et al., 2016; Foggi et al., 2017a; Foggi et al., 2017b; de Oliveira et al., 2017). Despite these favorable results, little is known about the action of these microcrystals on microbial biofilms.

An important concern regarding such new materials is their biocompatibility with tissues, as the free radicals generated can also affect mammalian cells (Schieber and Chandel, 2014). Although reactive oxygen species (ROS) act as molecular signals in the regulation of physiological processes, they can lead to hyperactivation of the inflammatory response at high levels (Schieber and Chandel, 2014). Oxidative stress generated by ROS causes the activation of the MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) signaling pathway, which induces transcription factors such as NF- κ B (Nuclear Factor kappa B), leading to the production of pro-inflammatory cytokines (Park and Park, 2009). Previous studies based on monolayer cell growth model have shown that, at some concentrations, α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ and β -Ag₂MoO₄ microcrystals were not cytotoxic (Haro Chávez et al., 2018; Assis et al., 2019; Pimentel et al., 2020). Although traditional monolayer cell culture models are still predominant, they may fail to reproduce the complex and dynamic environment of in vivo tissues. As a result, there may be false results or inconsistencies, since in such model the cells are “forced” to adapt to a rigid and artificial surface (Brohem et al., 2010). Another important point is regarding the type of cells in the culture, since it is known that the greater the number of cell lines involved, the more reliable the responses obtained in in vitro assays (Zhou et al., 2015).

In the present investigation, a three-dimensional cell co-culture model containing fibroblasts, keratinocytes, and monocytes was developed to assess the biocompatibility and inflammatory responses of α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄

microcrystals, as well as to evaluate the antifungal activity of the materials against *C. albicans* biofilms.

2. Article types: Original Article - Biomacromolecules Systems Applied to Medical Implants for the Release of Therapeutic Agents

3. Materials and Methods (APÊNDICE A)

3.1 Microcrystal's synthesis and characterization

The synthesis of α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ microcrystals were performed using the coprecipitation method in an aqueous medium, as published in previous studies (Fabbro et al., 2016; Foggi et al., 2017b; Pimentel et al., 2020). First, 1×10^{-3} mol of the Ag⁺ precursor (AgNO₃, Cennabras, 99.98 %) was diluted in 50 mL of distilled water. Concomitantly, the precursors of the lattice formers were diluted in stoichiometric amounts in 50 mL of distilled water (1×10^{-3} mol of NH₄VO₃ (Aldrich, 99.99 %), or 5×10^{-4} mol of Na₂WO₄·2H₂O (Aldrich, 99.99 %), or Na₂MoO₄ (Alpha Aesar, 99.98 %)). Temperatures of 10°C for α -AgVO₃ and 70°C for α -Ag₂WO₄ and β -Ag₂MoO₄ were used. After the solutions reached the required temperatures, the lattice former solutions were added to the Ag⁺ solution, instantly forming the precipitates. These precipitates were washed with distilled water to pH 7 and oven-dried at 60 °C for 12 h. After synthesis, all three microcrystals were diluted in PBS at a stock concentration of 2 mg/mL. The materials were characterized by X-Ray Diffraction (XRD) using a Rigaku-DMAX/2500PC (Rigaku, Tokyo, Japan) with Cu K α radiation and by micro-Raman spectroscopy using a Horiba Jobin-Yvon spectrophotometer coupled to a CCD Synapse detector and using a 514 nm argon laser.

The microcrystals concentrations evaluated in the present study were based on previous studies (Fabbro et al., 2016; Foggi et al., 2017b; Pimentel et al., 2020) according to the minimal inhibition concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) against *C. albicans* (Table 1).

3.2 Cell culture conditions

For the present study, three cell lines were used, FGH (Rio de Janeiro Cell Bank; code: 0089), THP-1 (Rio de Janeiro Cell Bank; code: 0234), and NOK-si cells (kindly provided by Professor Carlos Rossa Jr., from the Cellular and Molecular Biology

Laboratory, Department of Periodontics, School of Dentistry, São Paulo State University - Unesp). NOK-si and FGH cells were cultured in High Glucose (4.5 g/L) Dulbecco Eagle's Modified Medium (DMEM; GIBCO, NY, USA) supplemented with L-Glutamine (2 mM/L; Lonza, Basel, Switzerland); Fetal Bovine Serum (FBS; 10 % v/v; GIBCO, NY, USA) and 1 % v/v antibiotic/antimycotic solution (penicillin G - 10.000 µg/mL, streptomycin - 10.000 µg/mL and amphotericin B - 25 µg/mL) (Sigma-Aldrich, MO, USA) 107. THP-1 cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640) supplemented with 2 mM glutamine, 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich, MO, USA), 1 mM sodium pyruvate, 4.5 g/L glucose, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 10 % v/v FBS and 0.09% v/v β-mercaptoethanol (Gibco, NY, EUA). All cells were incubated at 37 °C with 5 % CO₂.

3.3 3D cell co-culture model

For the development of the three-dimensional (3D) cell co-culture model, cells were grown until they reached 90 % confluence. The cells were washed with sterile phosphate-buffered saline solution (PBS, pH 7.2), detached with trypsin solution (0.05 % v/v)/EDTA (0.53 mM/ L) (Sigma-Aldrich®, MO, USA), and centrifuged at 400 × g for 5 min. The protocol used was adapted from Haro Chávez et al. (2018) (Haro Chávez et al., 2018). Briefly, 2.3 mL of DMEM medium, 450 µL of FBS, 1.5 mL of rat tail collagen (First Link, Wolverhampton, United Kingdom), 200 µL of NaOH (1 M), 250 µL of FGH cell suspension (6×10^6 cells/mL) and 100 µL THP-1 cell suspension (1.5×10^6 cells/mL) were added to a 50 mL conical tube. The solution was carefully mixed and plated in a 24 well plate. Next, 500 µL of the solution was added to each well and the plate was incubated until polymerization of the collagen at 37 °C with 5 % CO₂. After polymerization, 75 µL of NOK-si cell suspension (2×10^6 cells/mL) was added. The plate was incubated for 24 h for adhesion and formation of the keratinocyte layer.

3.4 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) of the noninfected 3D co-culture model

To characterize the 3D co-culture model, CLSM assays were performed. All CLSM assays were performed with the LSM 800 Carl Zeiss with ZenBlue Software 2.3. Prior to making the 3D co-culture model, THP-1 cells were stained with Cell Trace CFSE probe (ThermoFischer Scientific, MA, USA) to confirm this cell phenotype in the deep layers of the 3D co-cultures. So, THP-1 cells were washed twice with PBS and

centrifuged at $400 \times g$ for 5 min before their collection. The pellet was re-suspended and diluted in PBS to obtain a 1.5×10^6 cells/mL THP-1 cell suspension. Next, 2 μ L of the Cell Trace CFSE loading solution was added to the cell suspension and the tube was incubated at 37 °C. After 20 min, 20 μ L of FBS was added and the cells were centrifuged at $400 \times g$ for 3 min. The pellet was washed twice with PBS supplemented with 2 % v/v FBS. After the washing steps, the pellets were re-suspended in 1 mL of DMEM media without FBS prior to use for 3D culture formation (already described 3.2). For CLSM, 3D co-cultures were washed with PBS and fixed with paraformaldehyde (4 % v/v) for 30 min at 37 °C. Next, the plates were washed with PBS and Triton (0.1 % v/v) was added. After 10 min of incubation, the wells were washed twice with PBS and labeled with ActinRed™ 555 ReadyProbes™ reagent (ThermoFischer Scientific, MA, USA) for 30 min. Then, 3D co-cultures were washed with PBS before CLSM visualization. For the image acquisition, 488 nm and 561 nm lasers were used.

For the 3D co-cultures exposed to α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ and β -Ag₂MoO₄, the media was collected and stored at -20 °C for cytokine analysis, previously to the staining protocol. Next, 500 μ L of the Hoechst 33342 and Propidium iodide (PI) (1:1000) (Sigma-Aldrich, MO, USA) were added to each well and incubated for 10 min, protected from light. Next, the 3D co-cultures were washed with PBS, 300 μ L of paraformaldehyde (4 % v/v) were added to each well and the plates were incubated for 20 min at 37 °C. After 20 min, the plates were washed with PBS and 300 μ L of Triton (0.1 % v/v) were added and incubated for 10 min. Next, the wells were washed with PBS. After washing, Alexa-488 Phalloidin™ (ThermoFischer Scientific, MA, USA) was added (300 μ L/3D co-culture model) and incubated for 30 min. Next, 3D co-cultures were washed and finally, 500 μ L of PBS was added prior to the CLSM assays. For the image acquisition, 405 and 488 nm lasers were used in the X, Y, and Z axis.

3.5 Cytotoxic assay in noninfected 3D co-culture model

For the assessment of the α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ and β -Ag₂MoO₄ cytotoxicity, the microcrystals were added to the 3D co-culture model and co-cultured for 24 h. The cell viability was determined by MTT by tetrazolium salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, MO, USA) assay, as described by Dias KC et al. (2017) (Dias et al., 2017). Briefly, the media was collected from the plates, and the wells were washed with PBS. Next, 400 μ L of MTT in RPMI without phenol was added (2 mg/mL) in each well and the plate was incubated for 4 h at 37 °C

and 5 % CO₂. After solubilization of formazan crystals, the plate was measured at 562 nm in an EZ Read 400 Microplate reader (BioChrom) with assistance from the Adapt 2.0 BioChrom software. The assay was performed in triplicate on three different occasions.

3.6 3D co-culture model infection with *C. albicans* biofilm

For the infection model, a *C. albicans* strain (ATCC 90028) was used. The yeast was unfrozen and cultured in a Sabouraud Dextrose Agar (SDA; KASVI, PR, Brazil) plate supplemented with chloramphenicol (0.1 g/L) and incubated for 24 h at 37 °C. For the pre-inoculum, 5 colonies were cultured in 10 mL of Yeast Nitrogen Base (YNB; BD Difco, CA, USA) supplemented with 100 mM glucose at 37 °C. After 16 h, the culture was diluted 1:20 in a fresh YNB medium and incubated at 37 °C for 8 h for inoculum formation. Next, the yeast was washed twice with PBS and centrifuged at $250 \times g$ for 10 min at 4 °C. The pellet was resuspended in RPMI-1640 buffered with HEPES (25 mM) and supplemented with 2 mM of L-glutamine and sodium bicarbonate (2 g/L). Then, to obtain a *C. albicans* cell suspension of 3×10^4 Colony-Forming Unit (CFU)/mL, a dilution was performed. Finally, 100 μ L of the *C. albicans* cell suspension was added to each well of the 24 well plate containing the 3D co-culture model. The plates were incubated for 24 h at 37 °C with 5 % CO₂.

3.7 Evaluation of the antifungal effect of the silver-containing microcrystals

To evaluate the antifungal effect of the silver-containing microcrystals, CFU/mL by plate count was performed. For this assay, the 3D co-culture models were collected and vortex with 1 mL of PBS for 5 min. After 5 min, 100 μ L were collected and diluted 1:1000 in PBS. Then, 20 μ L of each diluted solution were plated in SDA plates and incubated at 37 °C for 24 h. Next, the number of colonies was counted, and the CFU/mL was calculated. Fluconazole (FCZ) at 120 μ g/mL was used as standard drug control. The experiment was performed in triplicate on three different occasions.

The antifungal effect of silver-containing microcrystals on 3D co-culture was also evaluated by CLSM using LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, OR, USA). Briefly, after collecting and vortexing the 3D co-culture model as described previously, an aliquote of 100 μ L of each experimental group was stained with PI and Syto 9 (1:1000) diluted in PBS. Then, 1 mL of the solution was added to confocal plates and incubated for 30 min protected from light, followed by CLSM

observation. The laser was fixed at 488 nm with 4 % power for the excitation of both probes. For emission, 530 nm were used for Syto9 detection and 610 nm for PI detection, both with a gain of 700 V in the X, Y, and Z axis. Fluconazole (FCZ) at 120 µg/mL was used as standard drug control. The experiment was performed in duplicate on two different occasions.

3.8 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) of the infected 3D co-culture model

To characterize the 3D co-culture model, CLSM assays were performed. First, THP-1 cells were stained with a Cell Trace CFSE probe as already described (section 3.3). After ActinRed™ staining, CalcoFluor White (CW) probe (Sigma-Aldrich, MO, USA) was added. For this, 20 µL of CW and 20 µL of 10 % v/v KOH were added to each well and the plate was incubated at room temperature. After 10 min, the wells were washed with PBS prior to the CLSM assay. For the image acquisition, 405 nm and 561 nm lasers were used.

For the infected 3D co-culture model challenged with α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ and β -Ag₂MoO₄, the media were collected and stored at -20 °C for cytokine analysis, previously to staining protocol. Next, 500 µL of PI (1:1000) were added to each well and incubated for 10 min, protected from light. After 10 min, the 3D co-cultures were washed with PBS. Next, 300 µL of paraformaldehyde (4 % v/v) were added to each well and the cultures were incubated for 20 min at 37 °C. The plates were washed with PBS and 300 µL of Triton (0.1 % v/v) was added and incubated for 10 min. Then, the wells were washed with PBS. Thereafter, Alexa-488 Phalloidin™ (ThermoFischer Scientific, MA, USA) was added and incubated for 30 min. The 3D co-cultures were washed and finally, 500 µL of PBS was added prior to the CLSM assays. For the image acquisition, 405 and 488 nm lasers were used in the X, Y, and Z axis.

3.9 Cytometric Bead Array (CBA)

For cytokine detection, the BD™ cytometric bead assay was used. Briefly, the lyophilized Human Inflammatory Cytokines Standards were reconstituted with 2 mL of Assay Diluent. Next, a serial dilution was performed until 1:256 dilution. Negative control was prepared with only Assay Diluent. Then, a mix of capture beads were prepared. In cytometry tubes properly named with standard curve points and samples were added 50 µL of the mixed Capture Bead. Next, 50 µL of the Human Inflammatory

Cytokines Standard previously serially diluted were added to the standard curve tubes and 50 μL of each sample were added to its respective tube. Then, 50 μL of the Human Inflammatory Cytokines PE Detection Reagent were added to all the tubes, which were incubated at room temperature and protected from light. After 3 h, 1 mL of Wash Buffer was added to each tube followed by centrifugation at $200 \times g$ for 5 min. The supernatant was then discarded and 300 μL of Wash Buffer was added to each tube. The samples were acquired in a BD FACSAria™ Fusion Flow Cytometer. Data were analyzed with the FCAP Array v. 3.1 software.

3.10 Statistical Analysis

To assess the distribution and homoscedasticity of the data, the Shapiro-Wilk and Levene tests were applied. As the data of CFU/mL did not show normal distribution, the analysis was performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. The data obtained from the MTT and CBA tests presented normal distribution and equality of variances. Thus, the one-way ANOVA test was performed, followed by Tukey's post-test for MTT data. CBA data were evaluated by Student t-test. All data were evaluated using the GraphPad Prism software version 5.0 (GraphPad Software, CA, USA), where $p < 0.05$ was considered statistically significant.

4. RESULTS

4.1 Microcrystal's characterization

After synthesis, all materials were structurally characterized in order to observe their respective crystalline phases, as well as their purity. By both XRD and micro-Raman spectroscopy (Figure 1), it was possible to identify the formation of the monoclinic phase in $\alpha\text{-AgVO}_3$, characteristic of such compound, with space group C2/c, in agreement with the Inorganic Crystal Structure Database (ICSD), card No. 50645 (de Oliveira et al., 2017). For $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, the monoclinic structure with Pn2n space group was obtained, in accordance with ICSD card No. 248969 (Assis et al., 2018; 2019; 2020; 2021). The $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ was related to ICSD card No. 238013, with cubic structure and Fd3m space group (Penha et al., 2020; Foggi et al., 2020). In all cases, no additional phases were observed, indicating the high purity of the materials.

Figure 1

4.2 Characterization of the 3D co-culture model

To characterize the 3D co-culture model, a CLSM analyses was performed. It was observed that the noninfected 3D co-culture was formed by an epithelial layer of 70 μm thickness connected to the collagen matrix layer of 130 μm thickness, containing FGH (red) and THP-1 cells (green) (Figure 2, left field, white bar 1). The 3D co-culture model infected with *C. albicans* biofilm had a total thickness of 210 μm , with an epithelial layer of 80 μm colonized by the biofilm (Figure 2, right field, bar 2) and connected to the collagen matrix layer containing inflammatory cells (green) of 130 μm (Figure 2, right field, line 3).

Figure 2

4.3 Biocompatibility of the microcrystals in noninfected 3D co-culture model

To assess biocompatibility, the 3D co-culture models were challenged with the microcrystals for 24 h and then analyzed by MTT and CLSM (Figure 3). The microcrystals $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, $\alpha\text{-AgVO}_3$ (3.9 $\mu\text{g/mL}$) and $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ showed no decrease in cell viability as compared to control (Figure 3A). However, a significant decrease in cell viability ($p < 0.0001$) was observed when the 3D co-culture model was challenged with $\alpha\text{-AgVO}_3$ at 15.62 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 3A). Data obtained by MTT were confirmed by CLSM (Figure 3B), where different degrees of cell death in 3D co-culture models were detected by positive labeling with PI (Figure 3B, red panel).

Figure 3

4.4 Anti-biofilm effect of the silver-containing microcrystals

To evaluate anti-biofilm activity of microcrystals $\alpha\text{-AgVO}_3$, $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ and $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$, CFU/mL was performed (Figure 4A). It was not possible to observe significant reductions in microbial load when *C. albicans* biofilms were challenged with $\alpha\text{-AgVO}_3$ (3.9 $\mu\text{g/mL}$ and 15.62 $\mu\text{g/mL}$) and $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ microcrystals. On the other hand, $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ showed a significant reduction ($p < 0.0001$) of approximately 1.5 $\log_{10}$, with no significant difference to the standard treatment with FCZ. These findings were confirmed by LIVE/DEAD staining (Figure 4B), where it was possible to detect *C. albicans* cells labeled with PI (red) only for those 3D co-cultures challenged with $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ and FCZ (Figure 4B; red cells).

Figure 4

CLSM of the 3D co-culture models confirmed the findings of CFU/mL, where α -Ag₂WO₄ and FCZ showed similar anti-biofilm activity (Figure 5A). In these two groups, positive staining for CW (Figure 5A, blue panel) were significantly lower than the infected control, α -AgVO₃ (3.9 μ g/mL and 15.62 μ g/mL) and β -Ag₂MoO₄ groups. Further, lower number of epithelial dead cells labeled with PI were seen in α -Ag₂WO₄ and FCZ groups as compared to the other groups (Figure 5A, red panel). Similarly, α -Ag₂WO₄ and FCZ were less harmful to epithelial layer as revealed by phalloidin 488 stain (Figure 5A, green panel). Figure 5B also shows better preservation of the epithelial layer when 3D co-culture models were challenged with α -Ag₂WO₄ and FCZ. In these groups, the penetration of *C. albicans* (blue fluorescence of CW) was restricted to the epithelial layer (green fluorescence of phalloidin 488 in the upper layer of the 3D culture). In contrast, in the infected control group and α -AgVO₃ and β -Ag₂MoO₄ experimental groups, it was possible to notice the presence of black niches, representing the absence of phalloidin 488 labeling, and the increased blue fluorescence niches with CW, which is related to higher invasiveness of the *C. albicans* biofilm into the epithelial layer of the 3D cultures (Figure 5B, blue, green and merge panels).

Figure 5

4.5 Cytokine production

The cytokine production by 3D co-culture models was assessed by flow cytometry. In noninfected 3D co-culture models challenged with microcrystals, α -Ag₂WO₄ promoted a significant increase in IL-6 production compared to control ($p=0.0414$; Figure 6D). A significant increase in IL-8 production was also observed when the models were challenged with α -Ag₂WO₄ ($p=0.0053$; Figure 6N) and β -Ag₂MoO₄ ($p=0.0090$; Figure 6O). When compared to noninfected control, no statistically significant differences in the production of the cytokines (IL-6, IL-1 β , IL-8 and TNF α) were found, when the 3D co-culture models were challenged with α -AgVO₃ (3.9 μ g/mL and 15.62 μ g/ml). In 3D co-culture models infected with *C. albicans* biofilm (infected control), a significant increase in the production of IL-6 ($p=0.0023$; Figure 6A), IL-1 β ($p=0.0036$; Figure 6F) and IL-8 was observed ($p=0.0006$; Figure 6K) as compared to the noninfected control. However, no significant increase in TNF α was observed ($p=0.4351$; Figure 6P). In general, after the infected 3D co-culture models were challenged with microcrystals, no significant differences in the production of the

cytokines were observed in relation to noninfected 3D co-culture models also challenged with microcrystals. The only exception was the inhibition of TNF α production in infected models challenged with β -Ag₂MoO₄ (p=0.0012; Figure 6T).

Figure 6

5. DISCUSSION

In the present study, a 3D cell co-culture model was developed and used to evaluate the biocompatibility and anti-biofilm activity of silver-containing microcrystals. Several 3D cell co-culture models are currently used to study infectious processes, cell behavior, neoplasms, and biocompatibility (Mostefaoui et al., 2002; Klausner et al., 2007; Moharamzadeh et al., 2008; Kinikoglu et al., 2009; Yadev et al., 2011; Pinnock et al., 2014; Heller et al., 2016; Dias et al., 2018). These 3D co-culture models take into account the tissue anatomy to which they refer, making possible to better simulate a clinical situation when compared to monolayer cell cultures (Moharamzadeh et al., 2007). The complexity of these 3D co-culture models should also be considered, since the greater the number of cell lines involved in making these cultures, the more reliable the responses obtained in in vitro assays. Thus, three cell lines were used in the present work. The proposed 3D co-culture model included inflammatory cells (THP-1), embedded in a type 1 collagen matrix containing gingival fibroblasts (FGH). On the top surface of the polymerized matrix, it is possible to observe a layer of epithelial cells from the oral cavity (NOK-si). We also assessed the infectious process by *C. albicans* biofilms. It was observed 3D-co-culture model invasion by *C. albicans* cells which is in agreement with the literature, in both in vivo assays and in vitro models (Villar et al., 2007; Sun et al., 2010; Yang et al., 2014; Dias et al., 2018). Thus, the 3D co-culture model described here was considered appropriate to assess the biocompatibility of the silver-containing microcrystals, the infectious process caused by *C. albicans* biofilm, and the anti-biofilm activity of α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ and β -Ag₂MoO₄ microcrystals.

The biocompatibility of the microcrystals on the 3D co-culture model assessed by MTT and CLSM showed that only α -AgVO₃ at 15.62 μ g/mL was able to decrease cell viability in the 3D co-culture model. Previous studies have already evaluated the cytotoxicity of α -AgVO₃, β -Ag₂MoO₄, and α -Ag₂WO₄ microcrystals in monolayer cell culture, using FGH or NOK-si cell lines. In agreement to our results, these previous quantitative and qualitative assessments demonstrated that α -Ag₂WO₄ did not affect proliferation (Assis et al., 2019) and the mitochondrial enzymatic activity of FGH cells

cultured in a monolayer or the cell viability within 3D collagen matrices (Haro Chávez et al., 2018). Contrasting results from the present investigation have also been reported. Cytotoxic and genotoxic outcomes revealed that α -AgVO₃ at 15.62 μ g/mL did not affect NOK-si cell morphology, proliferation, or DNA integrity (Pimentel et al., 2020). Also, β -Ag₂MoO₄ was found to be cytotoxic to FGH cells (Haro Chávez et al., 2018), as opposed to what was observed in the present work. These previous findings are resulted from a single cell line and 2D culture model. Although they bring us important information, in a quickly and less costly way, they fail in reproduce the cell complex micro-environment (Brohem et al., 2010). When cells grow in 3D models, they have different proliferative capacity, metabolic functions and responses to harmful agents then when they grow in 2D, due to cell-cell signaling (Brohem et al., 2010). Also, the use of more than one cell line enables a more reliable analysis of the cellular response, since in cellular co-culture it is possible to more accurately simulate the cellular environment, especially when evaluating complex signals, such as the inflammatory responses (Zhou et al., 2015). This emphasizes the importance of more complex culture models, such as 3D co-culture models, when assessing the biocompatibility of biomaterials (Klausner et al., 2007).

The anti-biofilm activity was observed only in those infected 3D co-culture models challenged with α -Ag₂WO₄, which was similar to standard control (FCZ). Previous studies have already shown that such microcrystals have activity against *C. albicans* cells in their free form (planktonic), but not on biofilm (Fabbro et al., 2016; Foggi et al., 2017a; Foggi et al., 2017b; Assis et al., 2019; Pimentel et al., 2020). The clinical importance of biofilms is widely known, especially in the oral cavity. The literature has shown that, during infectious processes, microorganisms are not found in their planktonic form, but rather form multicellular aggregates in host tissues (Soll, 2008). When organized in biofilms, the microorganisms are more tolerant to antimicrobial agents, so that the concentration of drugs needed to eliminate the microorganism is greater when compared to that needed to eliminate its planktonic form (Silva et al., 2017). Thus, it is essential to evaluate the anti-biofilm properties when assessing new therapeutic strategies. In some studies, showing the activity of silver nanoparticles against *C. albicans* biofilms (Martinez-Gutierrez et al., 2013; Monteiro et al., 2014; Lara et al., 2015), the concentrations needed to decrease the viability of *C. albicans* by at least 1 Log₁₀ varied from 0.49 μ g/mL (Lara et al., 2015) up to 1000 μ g/mL (Martinez-Gutierrez et al., 2013). In contrast, the amount of silver in α -

Ag_2WO_4 at 7.81 $\mu\text{g/mL}$ concentration is extremely lower (0.015 $\mu\text{g/mL}$; 0.033 $\mu\text{mol/mL}$) when compared to those silver nanoparticle solutions (Haro Chávez et al., 2018) and still was able to reduce *C. albicans* by 1.5 $\log_{10}$. It is well known that silver could be toxic, not only to microorganisms but also to mammalian cells, causing DNA damage and even cell death. The range of concentration reported to be toxic to mammalian cells is between 10-100 $\mu\text{g/mL}$ (Chernousova and Epple, 2013), far higher than those used in the present study. Also, silver size influences its toxicity, so that, at the same silver concentration, smaller silver particles are more toxic than larger ones for they can easily being taken up by cells and interact with nuclei acids and cell membranes (Chernousova and Epple, 2013). Previous studies have shown that $\alpha\text{-AgVO}_3$, $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ and $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ are capable of producing reactive oxygen species (ROS) from the interaction between semiconductors (V, W and Mo) with water and oxygen present in the medium (Fabbro et al., 2016; Foggi et al., 2017a; Foggi et al., 2017b; de Oliveira et al., 2017; Assis et al., 2019). This has been shown to be the principal mechanism involved in their antimicrobial activity. Through photoluminescence analysis, it has been observed that $\alpha\text{-AgVO}_3$, $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ and $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ emit spectra in the blue and red regions, which are related to energy defects generated by microcrystals. These defects are responsible for promoting distortions in the molecules of microcrystals, generating OH^* and $\cdot\text{O}_2\text{H}^*$ and, consequently, causing the death of microorganisms by oxidative stress (Fabbro et al., 2016; Foggi et al., 2017a; Foggi et al., 2017b; de Oliveira et al., 2017; Assis et al., 2019).

Morphological analyzes of the 3D co-culture models also demonstrate that $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ had anti-biofilm activity similar to FCZ. Furthermore, it was observed that these two groups were capable of better preserv the epithelial cell layer and contain the infection in the epithelial layer. On the other hand, infected 3D co-culture models challenged with $\alpha\text{-AgVO}_3$ and $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$, as well as the control, showed the absence of the epithelial layer and a thicker biofilm of *C. albicans* (CW) reaching the collagen matrix layer. The destruction of epithelial cells observed in those groups is typical of invasion of *C. albicans* biofilms. Dias et al., (2018) (Dias et al., 2018) demonstrated that *C. albicans* biofilm was able to cause great alterations in an in vitro tissue model. It was observed that *C. albicans* hyphae is responsible for tissue invasion and destruction, even serving as bridge to other microorganisms that are unable to penetrate host tissue, such as *Staphylococcus aureus* (Dias et al., 2018). The cell damage was also proven by lactate dehydrogenase (LDH) level, which was

expressively increased in tissue models when *C. albicans* was present in biofilms (Dias et al., 2018). This capacity of *C. albicans* to attach and penetrate host tissue is related to hydrolytic enzymes, such as proteases and phospholipases, that are secreted by this microbial biofilms (Ingham et al., 2012; Zago et al., 2015). In the host, these enzymes play an important role in inflammatory and pathological responses during infection (Villar and Zhao, 2010).

Regarding cytokine production, α -Ag₂WO₄ promoted an increase in IL-6 and IL-8 production by noninfected 3D co-culture models. The increased levels were not different from those observed in infected 3D co-culture models though. As expected, *C. albicans* biofilm also increased the production of IL-6, IL-1 β and IL-8. *C. albicans* is known to modulate the cellular inflammatory response and stimulate the production of IL-6, IL-1 β and IL-8 (Dongari-Bagtzoglou and Kashleva, 2003; Gow and Hube, 2012; Qin et al., 2016; Richardson et al., 2019). The increase in these cytokines is important for fungal infection control, as IL-6 is responsible for the recruitment of neutrophils (Cheng et al., 2012); IL-1 β is related to IL-17 production, important for defense against *C. albicans* (Cheng et al., 2012); and IL-8 may act by increasing the anticandidal activity (Szolnoky et al., 2001) and proliferation of keratinocytes, essential for maintaining epithelial integrity and barrier function (Rennekampff et al., 2000). Despite demonstrated benefits, some silver-based materials can cause immunotoxicity if used at higher dosages with high amounts of silver ions. Such materials should be used within a therapeutic window that allows minimizing biofilm growth without leading to adverse inflammatory consequences and/or cytotoxicity.

CONCLUSION

Taking into account the observed cell responses and antifungal behavior of the microcrystals tested in the present work, α -Ag₂WO₄ seems to be a more promising biomaterial when compared to the others, having the ability to modulate the inflammatory response and minimize the infectious process via antifungal activity. Also, the results obtained in the present work showed, for the first time, a 3D co-culture model involving three cell lines with an inflammatory component that allow to better comprehend the action of biomaterials on human infected tissue. This model was considered a reliable tool for the biocompatibility assessment of α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ and β -Ag₂MoO₄, as well as in the investigation of the antifungal activity of these microcrystals against *C. albicans* biofilms.

6. Conflict of Interest

The authors declare that the present research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

7. Author Contributions

BNASP, PAB, and CEV conceptualization, methodology, result analysis. MA synthesized and characterized the microcrystals. FHM-D, PAB, and BNASP performed the experiments. BNASP performed the statistical analysis. BNASP, FHM-D, PAB, MA and CEV wrote the first draft of the manuscript. CEV and EL supervision and funding acquisition. All authors contributed to the manuscript revision, read, and approved the submitted version.

8. Funding

The present work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) grant # 2013/07296-2 (CEPID/CDMF), and the Council for Technical and Scientific Development (CNPq) grant # 431895/2016-3. BNASP was supported by FAPESP grant # 2018/01677-4. FHM-D was supported by Unesp grant # 88887.335189/2019-00. MA was supported by Coordination for the Improvement of High-Level Personnel (CAPES) finance code 001.

Acknowledgments

The authors would like to thank Unesp, FAPESP, CNPq and CAPES for the financial support.

References

Andriole, Vincent T. (2000). Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal therapy. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 16, 317–21. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00258-2](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00258-2).

- Assis, M., Robeldo, T., Foggi, C. C., Kubo, A. M., Mínguez-Veja, G., Condoncillo, E., et al. (2019). Ag nanoparticles/ α -Ag₂WO₄ composite formed by electron beam and femtosecond irradiation as potent antifungal and antitumor agents. *Sci. Rep.* 9, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46159-y>.
- Assis, M., Condoncillo, E., Torres-Mendieta, R., Beltrán-Mir, H., Mínguez-Veja, G., Oliveira, R., et al. (2018). Towards the scale-up of the formation of nanoparticles on α -Ag₂WO₄ with bactericidal properties by femtosecond laser irradiation. *Sci. Rep.* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19270-9>.
- Assis, M., Ponce, M. A., Gouveia, A. F., Souza, D., Costa, J. P. C., Teodoro, V., et al. (2021). Revealing the nature of defects in α -Ag₂WO₄ by positron annihilation lifetime spectroscopy: a joint experimental and theoretical study. *Cryst. Growth Des.* 21, 1093–1102. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.0c01417>.
- Assis, M., Ribeiro, R. A. P., Carvalho, M. H., Teixeira, M. M., Gobato, Y. G., Prando, G. A., et al. (2020). Unconventional magnetization generated from electron beam and femtosecond irradiation on α -Ag₂WO₄: a quantum chemical investigation. *ACS Omega*. 5, 10052–10067. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00542>.
- Brohem, C. A., Cardeal, L. B. S., Tiago, M., Soengas, M. S., Barros, S. B. M., and Maria-Engler, S. S. (2010). Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24, 35–50. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00786.x>.
- Canuto, M. M., and Rodero, F. G. (2002). Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infect. Dis.* 2, 550–63. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00371-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00371-7).
- Castilho, R. M., Squarize, C. H., Leelahavanichkul, K., Zheng, Y., Bugge, T., and Gutkind, J. S. (2010). Rac1 is required for epithelial stem cell function during dermal and oral mucosal wound healing but not for tissue homeostasis in mice. *PLoS ONE*. 5, e10503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010503>.

- Cheng, S. C., Joosten, L. A. B., Kullberg, B. J., and Netea, M. G. (2012). Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect. Immun.* 80, 1304–13. <https://doi.org/10.1128/IAI.06146-11>.
- Chernousova, S., and Epple, M. (2013). Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angewandte Chemie - Int. Ed.* 52, 1636–53. <https://doi.org/10.1002/anie.201205923>.
- Dias, K. C., Barbugli, P. A., Patto, F., Lordello, V. B., Penteado, L. A., Medeiros, A. I., et al. (2017). Soluble factors from biofilm of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* promote cell death and inflammatory response. *BMC Microbiol.* 17, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1031-5>.
- Dias, K. C., Sousa, D. L., Barbugli, P. A., Cerri, P. S., Salih, V. M., and Vergani, C. E. (2018). Development and characterization of a 3D oral mucosa model as a tool for host-pathogen interactions. *J. Microbiol. Meth.* 152, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.07.004>.
- Dongari-Bagtzoglou, A., and Kashleva, H. (2003). *Candida albicans* triggers interleukin-8 secretion by oral epithelial cells. *Microbial. Patho.* 34, 169–77. [https://doi.org/10.1016/S0882-4010\(03\)00004-4](https://doi.org/10.1016/S0882-4010(03)00004-4).
- Dovigo, L. N., Carmello, J. C., Carvalho, M. T., Mima, E. G., Vergani, C. E., Bagnato, V. S., et al. (2013). Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine®. *Biofouling.* 29, 1057–67. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.827668>.
- Fabbro, M. T., Foggi, C. C., Santos, L. P. S., Gracia, L., Perrin, A., Perrin, C., et al. (2016). Synthesis, antifungal evaluation and optical properties of silver molybdate microcrystals in different solvents: A combined experimental and theoretical study. *Dalton Trans.* 45, 10736–43. <https://doi.org/10.1039/c6dt00343e>.

- Foggi, C. C., Oliveira, R. C., Fabbro, M. T., Vergani, C. E., Andres, J., Longo, E., et al. (2017). Tuning the morphological, optical, and antimicrobial properties of α -Ag₂WO₄ microcrystals using different solvents. *Cryst. Growth Des.* 17, 6239–46. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b00786>.
- Foggi, C. C., Fabbro, M. T., Santos, L. P. S., Santana, Y. V. B., Vergani, C. E., Machado, A. L., et al. (2017). Synthesis and evaluation of α -Ag₂WO₄ as novel antifungal agent. *Chem. Phys. Lett.* 674, 125–129. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2017.02.067>.
- Foggi, C. C., Oliveira, R. C., Assis, M., Fabbro, M. T., Mastelaro, V. R., Vergani, C. E., et al. (2020). Unvealing the role of β -Ag₂MoO₄ microcrystals to the improvement of antibacterial activity. *Mat. Sci. Eng. C.* 111, e110765. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110765>.
- Gow, N. A. R., and Hube, B. (2012). Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Current Opinion Microbiol.* 15, 406–12. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.04.005>.
- Hamida, R. S., Ali, M. A., Goda, D. A., Khalil, M. I., and Al-Zaban, M.I. (2020). Novel biogenic silver nanoparticle-induced reactive oxygen species inhibit the biofilm formation and virulence activities of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 433. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00433>.
- Haro Chávez, N. L., Avila, E. D., Barbugli, P. A., Oliveira, R. C., Foggi, C. C., Longo, E., et al. (2018). 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.* 170, 505–13. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.023>.

- Heller, M., Frerick-Ochs, E. V., Bauer, H. K., Schiegnitz, E., Flesch, D., Brieger, J., et al. (2016). Tissue engineered pre-vascularized buccal mucosa equivalents utilizing a primary triculture of epithelial cells, endothelial cells and fibroblasts. *Biomater.* 77, 207–15. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.073>.
- Ingham, C. J., Boonstra, S., Levels, S., Lange, M., Meis, J. F., and Schneeberger, P. M. (2012). Rapid susceptibility testing and microcolony analysis of *Candida* spp. cultured and imaged on porous aluminum oxide. *PLoS ONE.* 7, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033818>.
- Junqueira, J. C., Jorge, A. O. C., Barbosa, J. O., Rossoni, R. D., Vilela, S. F. G., Costa, A. C. B. P. et al. (2012). 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). *Las. Med. Sci.* 27, 1205–12. <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1050-2>.
- Kim, K. J., Sung, W. S., Suh, B. K., Moon, S. K., Choi, J. S., Kim, J. G., et al. (2009). Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*.” *BioMetals.* 22, 235–42. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9159-2>.
- Kinikoglu, B., Auxenfans, C., Pierrillas, P., Justin, V., Breton, P., Burillon, C., et al. (2009). Reconstruction of a full-thickness collagen-based human oral mucosal equivalent.” *Biomater.* 30, 6418–25. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.08.010>.
- Klausner, M., Ayehunie, S., Breyfogle, B. A., Wertz, P. W., Bacca, L., and Kubilus, J. (2007). Organotypic human oral tissue models for toxicological studies. *Toxicol. in Vitro.* 21, 938–49. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.01.024>.
- Lara, H. H., Romero-Urbina, D. G., Pierce, C., Lopez-Ribot, J. L., Arellano-Jiménez, M. J., and Jose-Yacaman, M. (2015). Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. *J. Nanobiotechnol.* 13, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0147-8>.

- Lipovsky, A., Nitzan, Y., Gedanken, A., and Lubart, R. (2011). Antifungal activity of ZnO nanoparticles: the role of ROS mediated cell injury. *Nanotechnol.* 22, 105101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/10/105101>.
- Longo, V. M., Foggi, C. C., Ferrer, M. M., Gouveia, A. F., André, R. S., Avansi, W., et al. (2014). Potentiated electron transference in α -Ag₂WO₄ microcrystals with Ag nanofilaments as microbial agent. *J. Phys. Chem. A.* 118, 5769–78. <https://doi.org/10.1021/jp410564p>.
- Martinez-Gutierrez, F., Boegli, L., Agostinho, A., Sánchez, E. M., Bach, H., Ruiz, F., et al. (2013). Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms.” *Biofouling.* 29, 651–60. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.794225>.
- Moharamzadeh, K., Brook, I. M., van Noort, R., Scutt, A. M., Smith, K. G., and Thornhill, M. H. (2008). Development, optimization and characterization of a full-thickness tissue engineered human oral mucosal model for biological assessment of dental biomaterials. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 19, 1793–1801. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3321-1>.
- Moharamzadeh, K., Brook, I. M., van Noort, R., Scutt, A. M., and Thornhill, M. H. (2007). Tissue-engineered oral mucosa: a review of the scientific literature. *J. Dent. Res.* 86, 115–24.
- Monteiro, D. R., Takamiya, A. S., Feresin, L. P., Gorup, L. F., Camargo, E. R., Delbem, A. C. B., et al. (2014). Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms to silver nanoparticles in intermediate and mature development phases. *J. Prosthodont. Res.* 59, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.jpor.2014.07.004>.
- Mostefaoui, Y., Claveau, I., Ross, G., and Rouabhia, M. (2002). Tissue structure, and IL-1 β , IL-8, and TNF- α secretions after contact by engineered human oral mucosa with dentifrices. *J. Clin. Periodontol.* 29, 1035–41. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051X.2002.291109.x>.

- Naglik, J. R., König, A., Hube, B., and Gaffen, S. L. (2017). *Candida albicans*–epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* 40, 104–12. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.030>.
- Oliveira, R. C., Foggi, C. C., Teixeira, M. M., Silva, M. D. P., Assis, M., Francisco, E. M., et al. (2017). Mechanism of antibacterial activity via morphology change of α -AgVO₃: theoretical and experimental insights. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 9, 11472–81. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b00920>.
- Panáček, A., Kolář, M., Večeřová, R., Pucek, R., Soukupová, J., Kryštof, V., et al. (2009). Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomater.* 30, 6333–40. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.065>.
- Park, E. J., and Park, K. (2009). Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicol. Let.* 184, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.10.012>.
- Pellon, A., Nasab, S. D. S., and Moyes, D. L. (2020). New insights in *Candida albicans* innate immunity at the mucosa: toxins, epithelium, metabolism, and beyond. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00081>.
- Penha, M. D., Gouveia, A. F., Teixeira, M. M., Oliveira, R. C., Assis, M., Sambrano, J. R., et al. (2020). Structure, optical properties, and photocatalytic activity of α -Ag₂W_{0.75}Mo_{0.25}O₄. *Mater. Res. Bull.* 132, 111011. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2020.111011>.
- Pimentel, B. N. A. S., Foggi, C. C., Barbugli, P. A., Oliveira, R. C., Avila, E. D., Longo, E., et al. (2020). Antifungal activity and biocompatibility of α -AgVO₃ microcrystals: a promising material against oral *Candida* disease. *Mater. Sci. Eng. C.* 108, 110405. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110405>.

- Pinnock, A., Murdoch, C., Moharamzadeh, K., Whawell, S., and Douglas, C. W. I. (2014). Characterisation and optimisation of organotypic oral mucosal models to study *Porphyromonas gingivalis* invasion. *Microb. Infect.* 16, 310–19. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.01.004>.
- Qin, Y., Zhang, L., Xu, Z., Zhang, J., Jiang, Y. Y., Cao, Y., et al. (2016). Innate immune cell response upon *Candida albicans* infection. *Virulence*. 7, 512–26. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1138201>.
- Rennekampff, H. O., Hansbrough, J. F., Kiessig, V., Doré, C., Sticherling, M., and Schröder, J. M. (2000). Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing. *J. Surg. Res.* 93, 41–54. <https://doi.org/10.1006/jsre.2000.5892>.
- Richardson, J. P., Moyes, D. L., Ho, J., and Naglik, J. R. (2019). *Candida* innate immunity at the mucosa. *Semin. Cell Dev. Biol.* 89, 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.026>.
- Salerno, C., Pascale, M., Contaldo, M., Esposito, V., Busciolano, M., Milillo, L., et al. (2011). *Candida*-associated denture stomatitis. *Med. Oral, Patol. Oral Cir. Bucal.* 16, e139–43. <https://doi.org/10.4317/medoral.16.e139>.
- Sardi, J. C.O., L. Scorzoni, T. Bernardi, A. M. Fusco-Almeida, and M. J.S. Mendes Giannini. 2013. “*Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options.” *Journal of Medical Microbiology* 62 (PART1): 10–24. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>.
- Schieber, Michael, and Navdeep S. Chandel. 2014. “ROS function in redox signaling and oxidative stress.” *Current Biology* 24 (10): R453–62. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>.

- Silva, Sónia, Célia F. Rodrigues, Daniela Araújo, Maria Elisa Rodrigues, and Mariana Henriques. 2017. "*Candida* species biofilms' antifungal resistance." *Journal of Fungi* 3 (1). <https://doi.org/10.3390/jof3010008>.
- Soll, David R. 2008. "*Candida* biofilms: is adhesion sexy?" *Current Biology* 18 (16): 717–20. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.068>.
- Sudbery, Peter, Neil Gow, and Judith Berman. 2004. "The distinct morphogenic states of *Candida albicans*." *Trends in Microbiology* 12 (7): 317–24. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.05.008>.
- Sun, Jianing N., Norma v. Solis, Quynh T. Phan, Jashanjot S. Bajwa, Helena Kashleva, Angela Thompson, Yaoping Liu, Anna Dongari-Bagtzoglou, Mira Edgerton, and Scott G. Filler. 2010. "Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1." *PLoS Pathogens* 6 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001181>.
- Szolnoky, Gyözö, Zsuzsanna Bata-Csörgö, Anna S. Kenderessy, Mária Kiss, Andor Pivarcsi, Zoltán Novák, Katalin Nagy Newman, et al. 2001. "A mannose-binding receptor is expressed on human keratinocytes and mediates killing of *Candida albicans*." *Journal of Investigative Dermatology* 117 (2): 205–13. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.14071.x>.
- Villar, C. C., H. Kashleva, C. J. Nobile, A. P. Mitchell, and A. Dongari-Bagtzoglou. 2007. "Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with e-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p." *Infection and Immunity* 75 (5): 2126–35. <https://doi.org/10.1128/IAI.00054-07>.
- Villar, C. C., and X. R. Zhao. 2010. "*Candida albicans* induces early apoptosis followed by secondary necrosis in oral epithelial cells." *Molecular Oral Microbiology* 25 (3): 215–25. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2010.00577.x>.

- Xie, Guo Hao, Xiang Ming Fang, Qiang Fang, Xin Min Wu, Yu Hong Jin, Jun Lu Wang, Qu Lian Guo, et al. 2008. "Impact of invasive fungal infection on outcomes of severe sepsis: a multicenter matched cohort study in critically ill surgical patients." *Critical Care* 12 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/cc6766>.
- Yadev, Nishant P., Craig Murdoch, Stephen P. Saville, and Martin H. Thornhill. 2011. "Evaluation of tissue engineered models of the oral mucosa to investigate oral candidiasis." *Microbial Pathogenesis* 50 (6): 278–85. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2010.11.009>.
- Yang, Weiming, Lei Yan, Chunrong Wu, Xiangwang Zhao, and Jianguo Tang. 2014. "Fungal invasion of epithelial cells." *Microbiological Research* 169 (11): 803–10. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.02.013>.
- Zago, Chaiene Evelin, Sónia Silva, Paula Volpato Sanitá, Paula Aboud Barbugli, Carla Maria Improta Dias, Virgínia Barreto Lordello, and Carlos Eduardo Vergani. 2015. "Dynamics of biofilm formation and the interaction between *Candida albicans* and methicillin-susceptible (MSSA) and -resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)." *PLoS ONE* 10 (4): 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123206>.
- Zhou, Guoying, Harald Loppnow, and Thomas Groth. 2015. "A macrophage/fibroblast co-culture system using a cell migration chamber to study inflammatory effects of biomaterials." *Acta Biomaterialia* 26: 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.08.020>.

Table 1. Microcrystals and their respective minimal inhibition concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) according to previous studies. † ²²; ¥ ¹⁹; * ²³.

Microcrystal	Concentration (µg/mL)
α -AgVO ₃	3.9 (MIC) *
	15.62 (MFC) *
α -Ag ₂ WO ₄	7.81 (MIC/MFC) †
β -Ag ₂ MoO ₄	15.62 (MIC/MFC) ¥

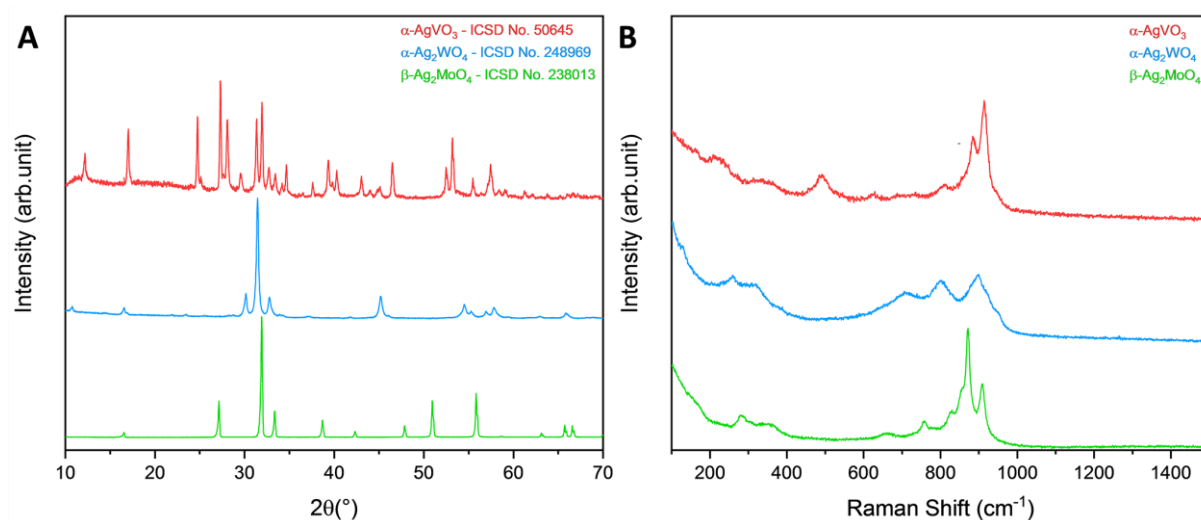


Figure 1. Characterization of α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ and β -Ag₂MoO₄ microcrystals. **(A)** XRD pattern. **(B)** micro-Raman spectroscopy.

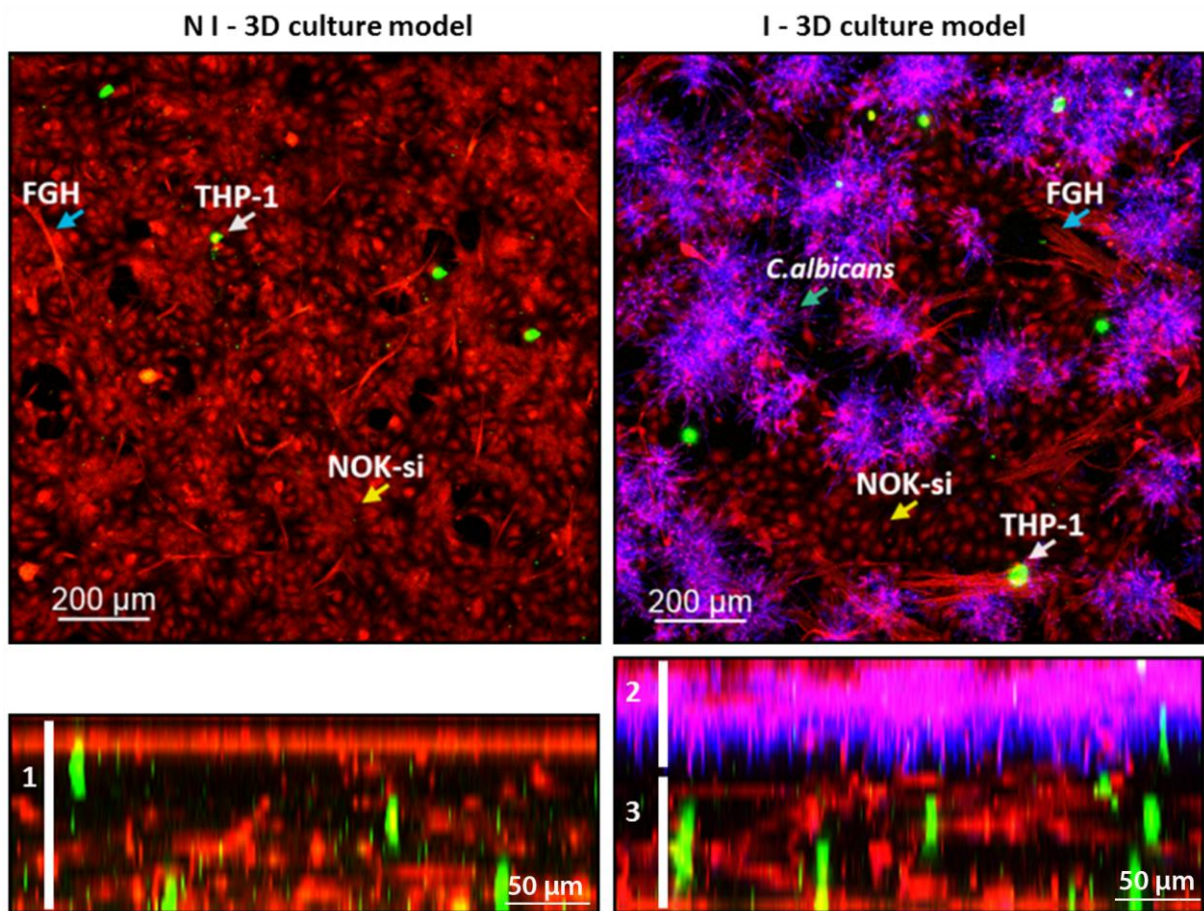
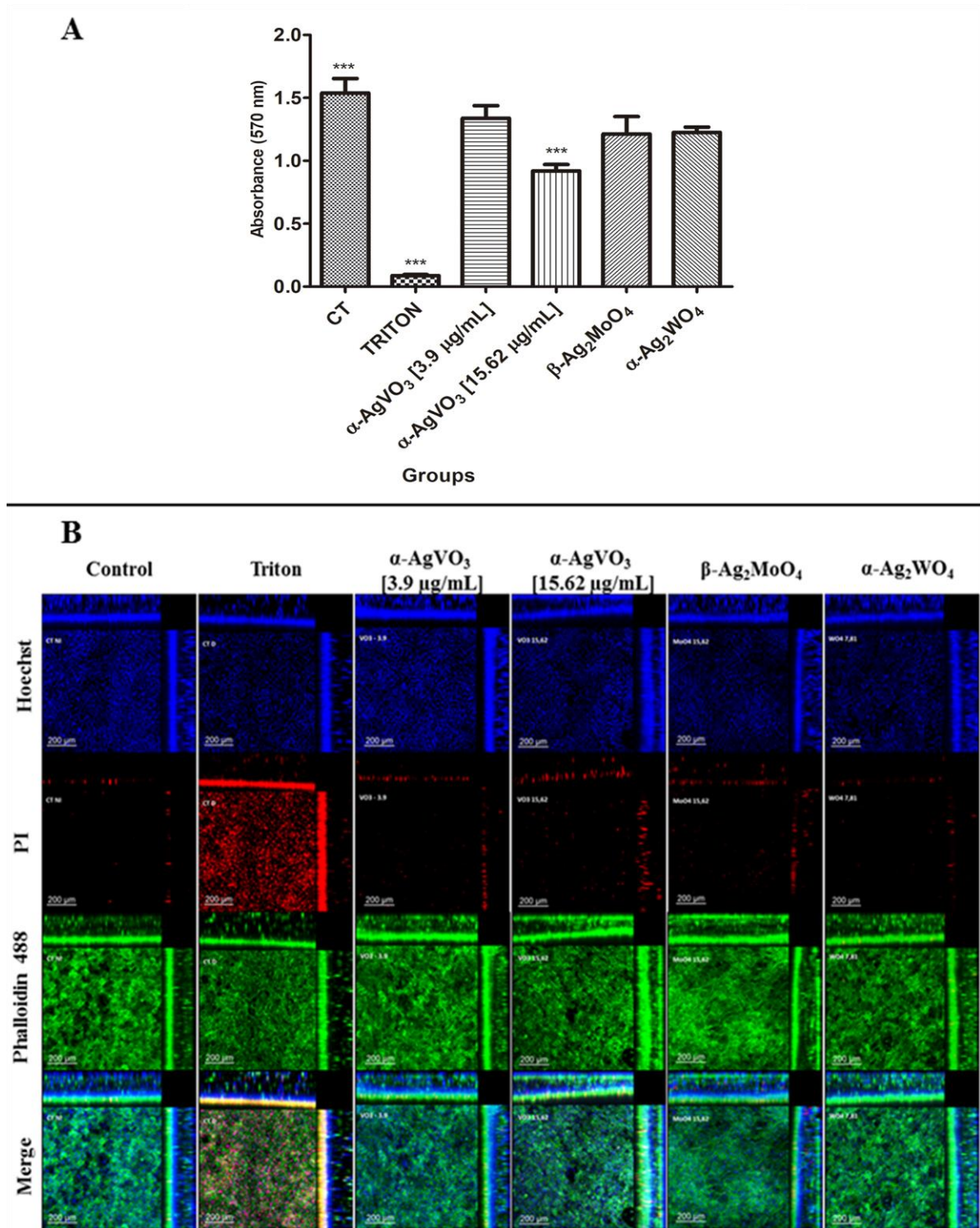


Figure 2. Confocal fluorescence microscopy of the infected and noninfected 3D co-culture models, collagen matrix stained with ActinRed 555 (red; cytoskeleton); CSFE (green; inflammatory cells); and CalcoFluor White (purple; *Candida albicans*). **(A)** Upper view of the noninfected 3D co-culture model, blue arrow; FGH cells, white arrow; THP-1 cells and yellow arrow; NOK-si cells. **(B)** Upper view of the infected 3D co-culture model, blue arrow; FGH cells, white arrow; THP-1 cells and yellow arrow; NOK-si cells, blue arrow over the CalcoFluor White staining; *C. albicans*. **(C)** Side view of the noninfected 3D co-culture model; demonstrating the formation of a monolayer of keratinocyte and the presence of the inflammatory cells within the 3D co-culture model. **(D)** Side view of the infected 3D co-culture model, demonstrating a formation of *C. albicans* biofilm adhered to the keratinocyte monolayer.



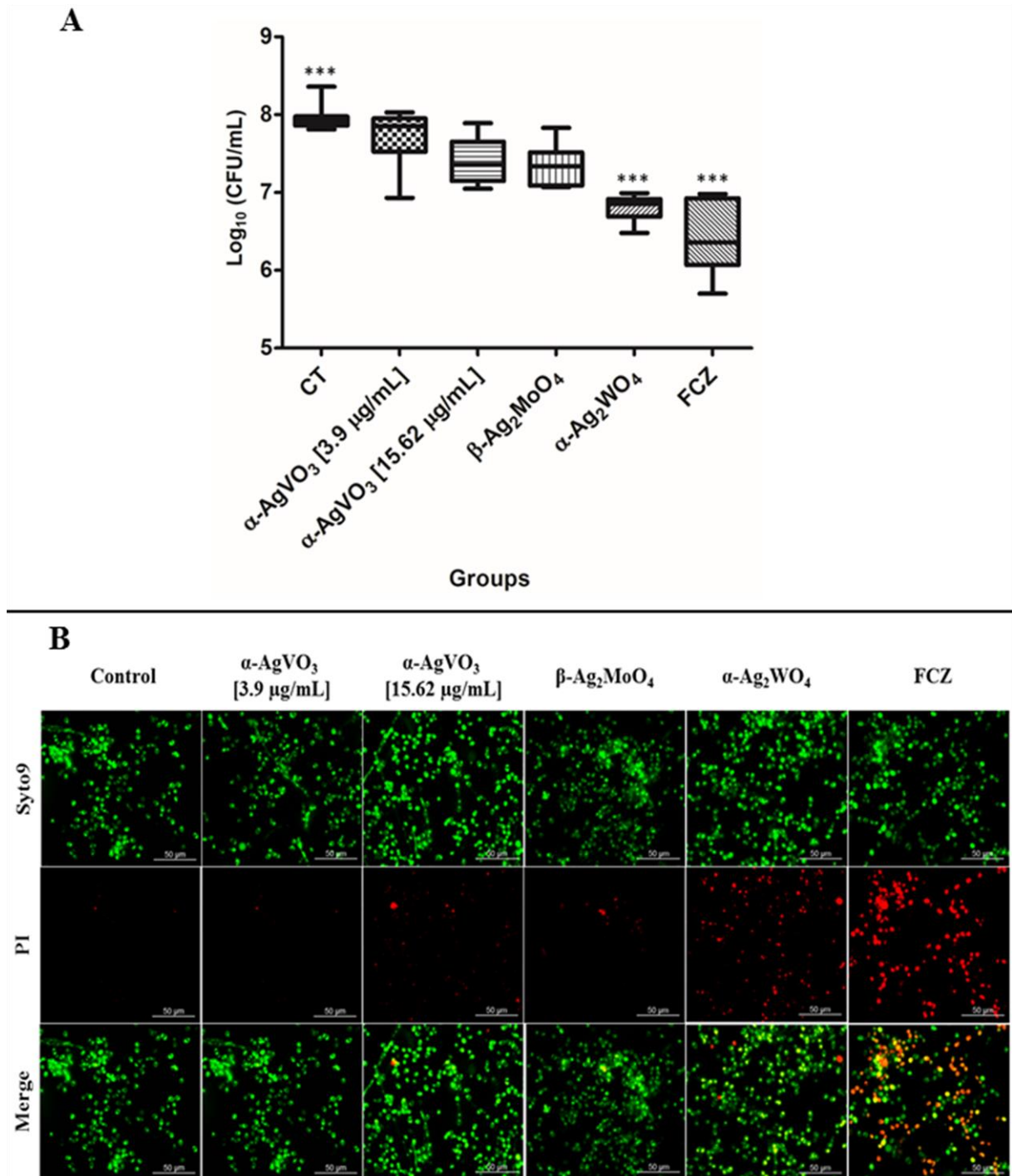


Figure 4. Antifungal effects of the microcrystals against *C. albicans*-infected 3D co-culture models. **(A)** Logarithmic CFU/mL counts of *C. albicans* after the exposition to the microcrystals in the infected 3D co-cultured model. Statistical difference observed in FCZ and α-AgWO₄. ****p* < 0.0001. **(B)** LIVE/DEAD confocal imaging of *C. albicans* cells exposed to the microcrystals; Syto9 staining for the live *C. albicans* cells; Propidium Iodate (PI) for the *C. albicans* dead cells; and the merge of the images.

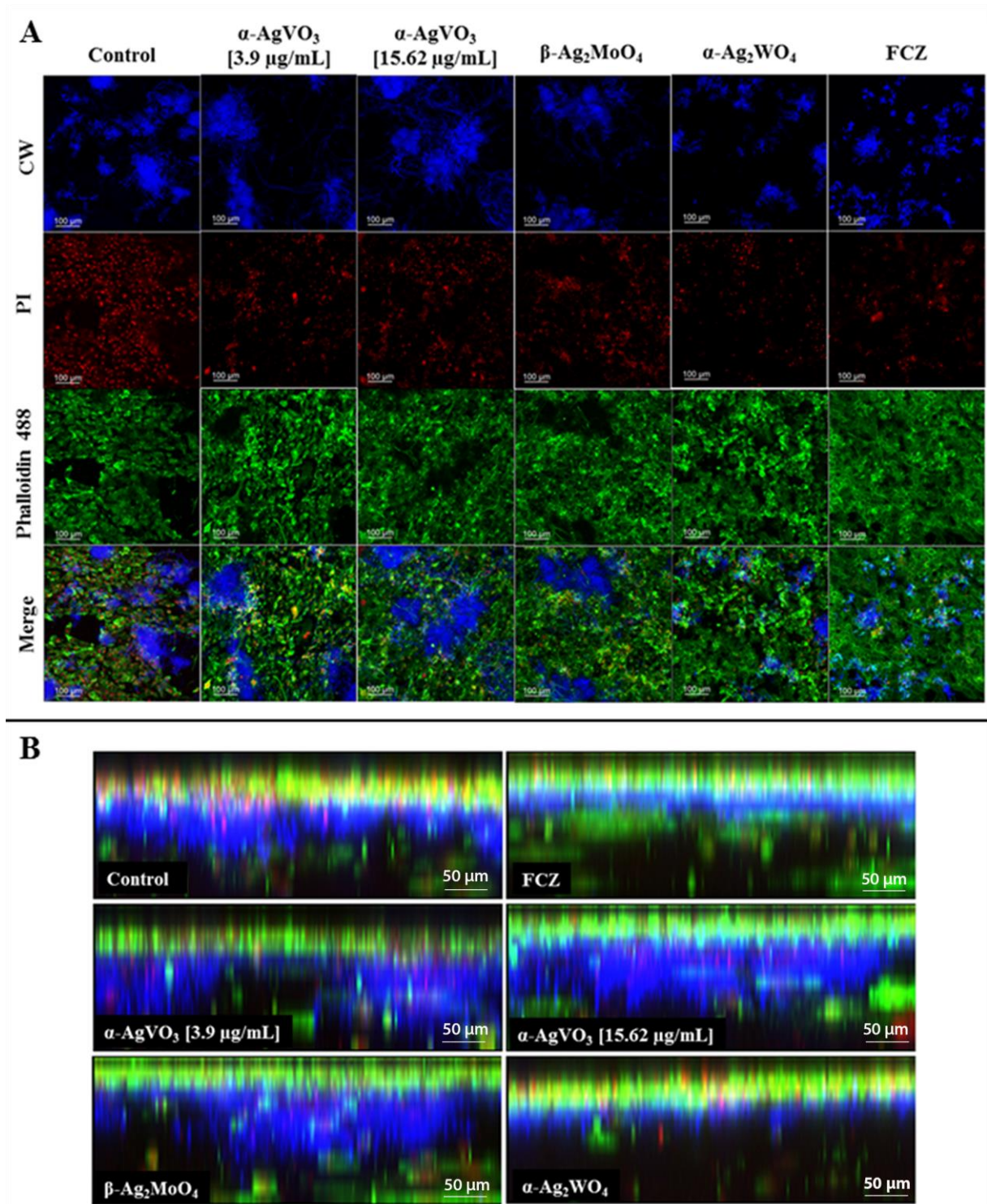


Figure 5. Confocal microscopy of the infected 3D co-culture models. CalcoFluor White staining for *C. albicans* (blue); Propidium Iodate (PI) staining for death cells (red); Phalloidin 488 staining for cytoskeleton (green), and the merge of the images. **(A)** Upper view of the confocal microscopy of the infected 3D co-culture models exposed to the microcrystals. **(B)** Side view of the confocal microscopy of the infected 3D co-culture models exposed to the microcrystals.

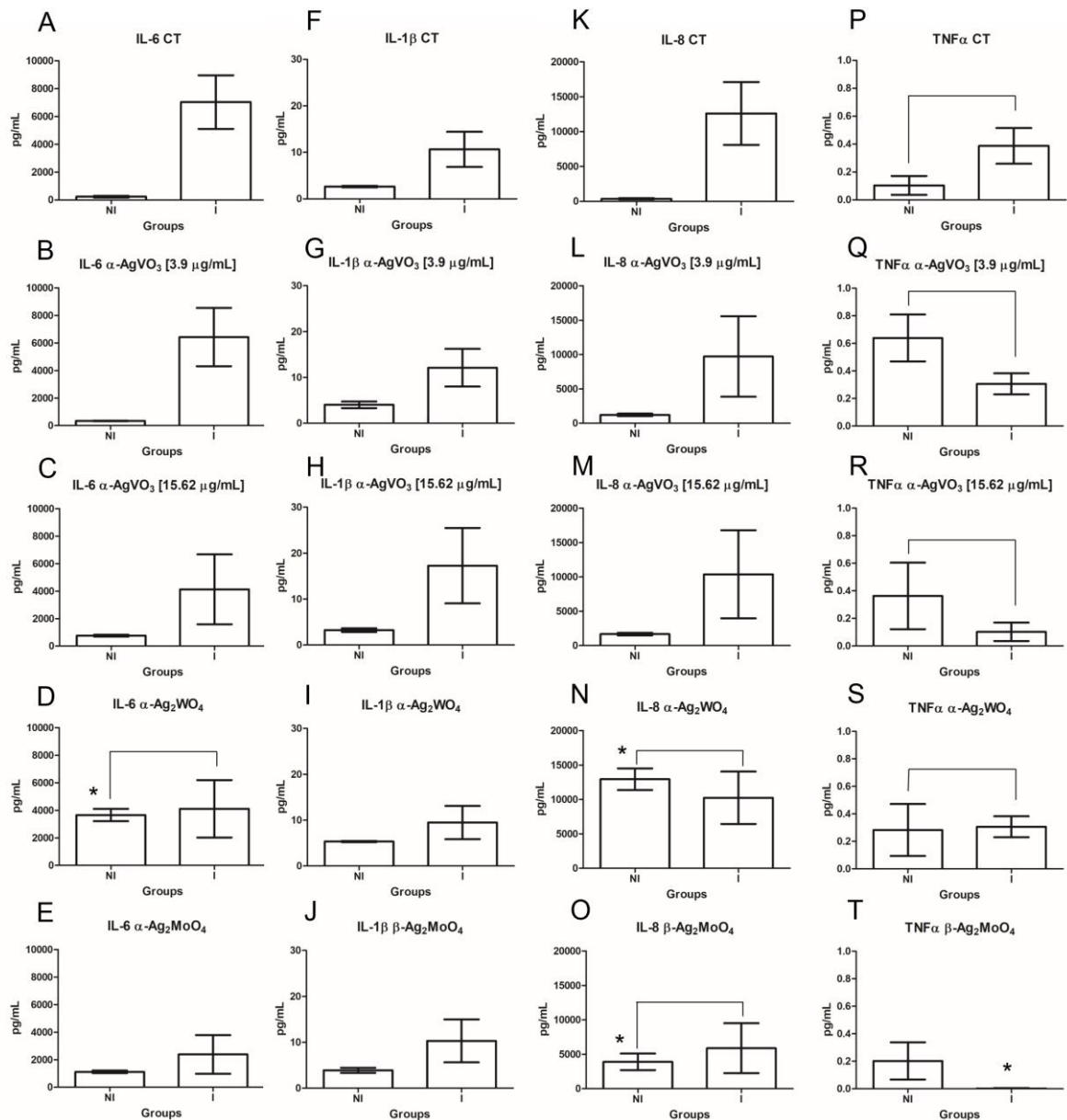


Figure 6. Comparisons in the cytokine (IL-6; IL-1 β ; IL-8; and TNF α) production between the infected and noninfected 3D co-culture models exposed to the microcrystals: * denotes statistical difference between each experimental group and its respective control. Connecting bars denote no significant difference between groups.

4 DISCUSSÃO

Materiais que apresentem propriedades antimicrobianas têm sido o foco de estudos na odontologia, com vistas a combater os microrganismos causadores de doenças orais que, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, têm apresentado tolerância/resistência aos fármacos disponíveis. Estudos envolvendo a prata têm se destacado pelo fato deste metal apresentar atividade antimicrobiana e baixa propensão a promover resistência nos microrganismos^{13,14,57-63}. Entretanto, efeitos citotóxicos podem ser observados a depender da concentração de prata utilizada, com uma faixa entre 10-100 µg/mL sendo considerada tóxica⁶⁴. Com o objetivo de reduzir a concentração de prata nos compostos para a mínima necessária a fim de manter suas propriedades antimicrobianas, bem como melhorar sua biocompatibilidade com as células do hospedeiro, a prata tem sido associada a diversos outros metais, como tungstênio, molibdênio e vanádio. O mecanismo de ação da prata e destes compostos está relacionado à geração de EROs, responsáveis pela inativação dos microrganismos¹⁸. Embora estudos prévios tenham demonstrado que α -Ag₂WO₄, β -Ag₂MoO₄ e α -AgVO₃ não apresentam citotoxicidade sobre células do tipo queratinócitos orais e fibroblastos gengivais^{23-25,27}, bem como ação antimicrobiana sobre suspensões de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina e *Escherichia coli*, ainda existem lacunas com relação à biocompatibilidade e atividade antimicrobiana sobre biofilmes.

Além da concentração utilizada, a toxicidade da prata também está relacionada ao tamanho e forma das partículas utilizadas, sendo estas características determinantes na sua capacidade de induzir a geração de EROs⁶⁵. A prata também pode induzir aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias e ativar células inflamatórias, como macrófagos, o que resulta em aumento de produção de EROs. O excesso de ERO produzida pode ultrapassar a capacidade antioxidante das células e resultar em estresse oxidativo, gerando efeitos patofisiológicos, como genotoxicidade, apoptose, necrose, inflamação, entre outros⁶⁵. Neste trabalho, foi possível demonstrar que, após 24 horas de exposição aos microcristais, as células THP-1 e macrófagos apresentaram pequena redução em sua viabilidade. Também foi comprovada a produção de O₂⁻ a partir de análise quantitativa da emissão de fluorescência e por meio de microscopia de fluorescência confocal. Apesar de neste trabalho termos avaliado apenas a produção da ERO O₂⁻, estudos prévios relatam que os microcristais

aqui avaliados também são capazes de gerar outras EROs, como o radical hidroxila e hidroperoxila^{19–22,25}. Essas EROs presentes no meio de cultura são capazes de ativar vias de sinalização relacionadas a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a cascata da proteína quinase ativada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase* - MAPK) e o fator nuclear κ B (*nuclear factor κ B* - NF- κ B)^{65,66}.

Os efeitos inflamatórios dos microcristais foram analisados através de ensaio de citometria de fluxo e ELISA para detecção de citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases de matriz, respectivamente, e observou-se que, para todos os microcristais, apenas a produção de IL-8 por THP-1 foi detectada nos dois tempos de exposição analisados (4 e 24 horas). Para macrófagos, após 4 horas de exposição, todos os microcristais apresentaram produção de IL-6, IL-1 β , TNF α e IL-8 menor que o grupo controle, e este padrão foi mantido para IL-6 e TNF α após 24 horas de exposição. Já para IL-1 β , foi observado um aumento em sua produção com relação ao grupo controle, exceto quando as células foram expostas a α -AgVO₃ (3,9 μ g/mL). Apesar da diminuição de IL-8 após 24 horas de exposição, sua produção continuou superior ao grupo controle. Murphy et al.⁶⁷ (2016) relataram aumento significativo nas citocinas IL-6, IL-1 e TNF α , após exposição das células THP-1 a nanopartículas de prata, o que não foi observado no presente estudo. Em outro estudo, Martinez-Gutierrez et al.⁵⁷ (2012) avaliaram o efeito de nanopartículas de prata sobre macrófagos e observaram aumento na produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF α , quando as células foram expostas a concentrações maiores que 10 μ g/mL. Apesar de no presente trabalho ter sido observado aumento na produção de IL-6 e TNF α após 24 horas de exposição aos microcristais, comparada à exposição de 4 horas, essa produção ficou bem aquém do controle. Uma possível explicação está relacionada à diferença no tamanho das partículas, uma vez que, comparadas aos microcristais, as nanopartículas possuem maior área de superfície em relação ao seu volume, sendo, portanto, mais reativas⁶⁸. Além disso, nanopartículas são capazes de penetrar a membrana celular e interagir com as organelas do citoplasma, ativando as vias moleculares relacionadas ao processo inflamatório⁵⁷.

Outro aspecto importante avaliado neste estudo diz respeito à produção de MMP-8 e -9. Essas metaloproteinases de matriz estão associadas a processos patológicos, como a periodontite e a peri-implantite, atuando na progressão da doença e perda óssea^{55,69}. A exposição de THP-1 e macrófagos aos microcristais resultou em diminuição e, até mesmo, não detecção destas MMPs. A literatura relata que TNF α é

um indutor de MMP-9⁷⁰, sendo assim, a menor produção desta citocina na presença dos microcristais pode explicar a redução na produção de MMP-9 pelas células. Com relação às MMP-8 e -9, foi possível observar que, quando detectadas, os valores observados sempre se mostraram inferiores ou equivalentes aos do grupo controle. Os achados deste primeiro estudo mostraram que os microcristais avaliados apresentaram respostas biológicas favoráveis, de forma que, juntamente com resultados de estudos prévios^{23–25,27}, é possível sugerir que estes microcristais são promissores candidatos para serem utilizados tanto em revestimentos como na incorporação aos materiais de uso médico-odontológico.

Uma vez comprovada a não citotoxicidade dos microcristais, bem como a produção de O_2^- e padrão de resposta inflamatória frente as células inflamatórias THP-1 e macrófagos, as análises subsequentes foram direcionadas para compreensão da ação de α -Ag₂WO₄, β -Ag₂MoO₄ e α -AgVO₃ sobre um modelo de co-cultivo 3D, bem como sobre biofilmes de *C. albicans*. Embora análises da biocompatibilidade dos microcristais sobre células orais humanas já tenham sido relatadas na literatura, por terem sido conduzidas sobre células em monocamada aderidas a placas de cultura, apresentam limitações na extrapolação dos dados, uma vez que o ambiente complexo e dinâmico dos tecidos *in vivo* não foi reproduzido. Essa limitação nos dados pôde ser evidenciada a partir dos resultados obtidos com o estudo 2, onde observou-se que o microcristal α -AgVO₃ (15,62 μ g/mL), que não havia sido considerado citotóxico para células do tipo NOK-si em monocamada²³, interferiu na viabilidade do modelo de co-cultivo 3D. Ao contrário, β -Ag₂MoO₄ não apresentou citotoxicidade sobre o modelo 3D, diferentemente dos achados iniciais sobre células do tipo FGH, em condições de cultivo semelhante²⁷. Para os demais microcristais, a viabilidade celular dos modelos foi semelhante ao grupo controle. Os achados de viabilidade aqui relatados reforçam a importância de, sempre que possível, trabalhar com modelos de cultivo de célula mais próximos das condições naturais, ou seja, um modelo 3D com mais de uma linhagem celular.

Apesar de apresentarem atividade antifúngica contra *C. albicans* comprovada^{19,21–23,25}, ainda não havia na literatura relatos acerca da ação de α -Ag₂WO₄, β -Ag₂MoO₄ e α -AgVO₃ sobre biofilme desta espécie de fungo. Biofilmes microbianos apresentam enorme importância clínica, principalmente na cavidade oral. Durante processos infecciosos, os microrganismos podem ser encontrados organizados na forma de biofilme, muitas vezes colonizando os tecidos do

hospedeiro⁷¹. A atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata sobre biofilmes de *C. albicans* foi avaliada em estudos prévios^{58,60,63}. Foi observada diminuição de pelo menos 1 log₁₀ na viabilidade de *C. albicans*, quando nanopartículas de prata em concentração entre 0,49 µg/mL⁶³ e 1000 µg/mL⁵⁸ foram utilizadas. O presente estudo demonstrou que apenas α-Ag₂WO₄ foi capaz de reduzir em 1,5 log₁₀ o biofilme de *C. albicans* formado sobre o modelo 3D, tendo esse resultado sido semelhante ao fármaco padrão (fluconazol). Esse achado é interessante, visto que a concentração aqui utilizada é a inibitória/fungicida mínima²², com uma concentração de prata extremamente baixa (0,015 µg/mL; 0,033 µmol/mL²⁴).

A partir dos aspectos morfológicos dos modelos de co-cultivo 3D infectados por *C. albicans*, também foi possível observar que α-Ag₂WO₄ e fluconazol apresentaram atividade antifúngica semelhante sobre os biofilmes. Em ambos os grupos, foi possível verificar que a camada epitelial foi preservada, o que impediu a penetração de *C. albicans*. Por outro lado, nos modelos de co-cultivo 3D infectados com *C. albicans* e tratados com α-AgVO₃ e β-Ag₂MoO₄, bem como no modelo sem tratamento (controle), foi possível observar maior penetração das células fúngicas e destruição da camada epitelial. Essa destruição é típica da invasão tecidual de *C. albicans*, tendo sido previamente demonstrada em outros estudos⁷².

Outro aspecto importante na avaliação de novos biomateriais diz respeito ao seu efeito inflamatório, especialmente quando o uso está direcionado para combater infecções microbianas. Isto porque, durante processos infecciosos, ocorre a modulação de citocinas pró-inflamatórias como mecanismo de defesa do organismo. No caso de infecções por *C. albicans*, tem sido relatado que a modulação da resposta inflamatória resulta em aumento na produção de IL-6, IL-1β e IL-8^{73–76}. Nos modelos não infectados do presente estudo, foi observado um aumento na produção de IL-6, após exposição a α-Ag₂WO₄, bem como aumento na produção de IL-8, após exposição a α-Ag₂WO₄ e β-Ag₂MoO₄. Esses níveis aumentados foram semelhantes àqueles observados nos modelos infectados por *C. albicans*. O aumento dessas citocinas é importante no controle da infecção fúngica, uma vez que elas atuam recrutando células do sistema imunológico e modulando a produção de outras citocinas, além de estimularem a proliferação celular relativa à manutenção da integridade da barreira epitelial^{77–79}.

O presente estudo fornece informações valiosas acerca da ação dos microcristais sobre células inflamatórias, sobre o modelo de co-cultivo 3D

desenvolvido e em relação à atividade contra biofilme de *C. albicans*. Entre os microcristais aqui avaliados e, levando em consideração os estudos prévios, α - Ag_2WO_4 parece ser o material mais promissor. Assim sendo, estudos futuros que avaliem a incorporação bem como o revestimento de materiais de uso médico-odontológico com esse microcristal devem ser considerados.

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, Makihiro 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, Makihiro 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. Metalloproteinases: 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, Kontinen 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-Yacamán M. Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. *J Nanobiotechnol*. 2015; 13: 91.
64. Chernousova S, Eppler 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.

APÊNDICE A – Metodologia

1 Obtenção dos microcristais

Esse projeto está inserido no Centro de Pesquisa para o Desenvolvimento de Materiais Funcionais (CDMF), um dos CEPIDs apoiados pela FAPESP (número do processo: 13/07296-2), sob a coordenação do Prof. Dr. Elson Longo (Instituto de Química, UFSCar, São Carlos, SP). Dessa forma, a síntese e a caracterização dos microcristais contendo prata foram realizadas pelo CDMF, no qual o Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani é pesquisador principal (área da Saúde)

Os microcristais contendo prata foram sintetizados pelo método de co-precipitação conforme descrito por Foggi et al.¹ (2017; síntese com água; α -Ag₂WO₄), Fabbro et al.² (2016; síntese com água; β -Ag₂MoO₄) e Oliveira et al.³ (2017; α -AgVO₃). Os precursores utilizados para essas sínteses foram: nitrato de prata (AgNO₃, 99,98 % de pureza, Cennabras), tungstato de sódio (Na₂WO₂·2H₂O, 99,99 % de pureza, Sigma-Aldrich), molibdato de sódio (Na₂MoO₄, 99,98 % de pureza, Sigma-Aldrich) e monovanadato de amônio (NH₄VO₃, 99,99 % de pureza, Sigma-Aldrich). Inicialmente, 1×10^{-3} mol de AgNO₃ foi diluído em 50 mL de água destilada (solução 01). Simultaneamente, 5×10^{-4} mol de Na₂WO₂·2H₂O ou 5×10^{-4} mol de Na₂MoO₄ ou 1×10^{-3} mol de NH₄VO₃ foram diluídos em quantidades estequiométricas em 50 mL de água destilada (solução 02) e aquecidos até as temperaturas de 10 °C (para AgVO₃) e 70 °C (para Ag₂WO₄ e Ag₂MoO₄) fossem atingidas. Então a solução 02 foi adicionada a solução 01, formando instantaneamente os precipitados. Estes precipitados foram lavados com água destilada até atingirem o pH 7, e então foram secos em estufa de secagem à 60 °C por 12 horas. Após a síntese, os microcristais foram diluídos em solução salina fosfatada (PBS; pH 7,0) na concentração inicial de 2 mg/mL. Os materiais foram caracterizados através de difração de raios-x e espectroscopia micro-Raman. Para o primeiro foi utilizado um difratômetro D/Max-2500PC (Rigaku) conformando uma radiação Cu K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) no intervalo de 2θ entre 70° e 10°, o que determinou as propriedades fundamentais dos materiais no estado cristalino. Informações químicas e estruturais dos compostos foram determinadas a partir de um espectrofotômetro (Horiba Jobin-Yvon) acoplado a um detector CCD Synapse utilizando laser de argônio com comprimento de onda de excitação de 514 nm.

2 Células e condições de cultivo

Para a realização deste trabalho foram utilizadas quatro linhagens celulares: NOK-si (queratinócitos orais normais espontaneamente imortalizados; célula gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior, do Departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp⁴), FGH (fibroblastos gengivais humanos; proveniente do Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ; código: 0089), THP-1 (monócitos derivados do sangue periférico humano; BCRJ, código: 0234) e THP-1 estimulada com PMA (12-mistato 13-acetato de forbol; macrófagos).

Para cada experimento, as células NOK-si e FGH foram descongeladas e cultivadas em meio de *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM; GIBCO, Grand Island, NY, EUA) de alta glicose (4,5 g/L), suplementado com 2,0 mmol.L⁻¹ de glutamina (Lonza, Basileia, Suíça), 10% de soro de bovino fetal (SFB; GIBCO, Grand Island, NY, EUA), 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina G - 10.000 µg.mL⁻¹, estreptomicina - 10.000 µg.mL⁻¹ e anfotericina B - 25 µg.mL⁻¹) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em estufa com 5% de CO₂, a 37 °C, em atmosfera úmida (Modelo Forma Series II Water Jacket CO₂ incubator; ThermoScientific, Waltham, MA, EUA). A linhagem THP-1 foi cultivada em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) contendo 2mM de glutamina, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sódio, 4,5 g/L de glicose, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 10% de SFB e 0,09% de β-mercaptoetanol (Gibco, Grand Island, NY, EUA). Para obtenção dos macrófagos, as células THP-1 foram estimuladas com 100 ng/mL de PMA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 48 horas, conforme descrito por Park et al. (2007)⁵. O crescimento celular foi monitorado diariamente com o auxílio de um microscópio de campo claro invertido (Optiphas, Van Nuys, CA, EUA).

As células foram cultivadas até atingirem 90% de confluência. Em seguida, as células foram lavadas com tampão PBS (pH 7,2), desprendidas da placa com solução de tripsina (0,005%)/EDTA (0,53 mmol.L⁻¹) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), submetidas à centrifugação a 400 × *g* por 5 minutos (NOK-si e FGH) e 200 × *g* por 10 minutos (THP-1) (Modelo 80-2B 15 mL; Centerbio, EUA) e ressuspendidas em seus respectivos meios. Previamente aos experimentos, as células foram contadas com o auxílio de um contador automático de células (Countess II FL, Life

Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e plaqueadas de acordo com o número de células estabelecido para cada protocolo experimental. Para todos os experimentos foram utilizadas células entre a 3ª e a 12ª passagem.

3 Ensaio de viabilidade celular das células em monocamada

Para análise da viabilidade celular foi utilizado o ensaio de alamarBlue™ (alamarBlue™ Cell Viability Reagent, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA). Este método é baseado na reação da resazurina, um corante não fluorescente azul arroxeado, solúvel em água, estável em meio de cultura, não tóxico, que pela ação da atividade metabólica das mitocôndrias de células viáveis, é reduzido em resorufina, substância rosa e altamente fluorescente. Esse ensaio foi realizado para analisar a viabilidade de células THP-1 e macrófagos quando em contato com os microcristais de α -Ag₂WO₄, β -Ag₂MoO₄ e α -AgVO₃.

Para tanto, células a partir da 3ª passagem, em meio contendo 5% de SFB, foram plaqueadas em placas de 12 poços em volume final de 3 mL/poço, na concentração de 1×10^6 células/poço e incubadas em estufa a 37 °C, com 5% CO₂, em atmosfera úmida por um período *overnight*. Para obtenção dos macrófagos, as células THP-1 previamente plaqueadas foram estimuladas com 3 µL de PMA/poço (100 ng/mL) e incubadas em estufa a 37 °C, com 5% CO₂, em atmosfera úmida. Após 48 horas, o meio de cultura contendo PMA foi removido e as células, agora aderentes, foram lavadas com PBS. Então, foi adicionado meio RPMI-1640 fresco completo contendo 5% de SFB em cada poço, e as placas foram mantidas em estufa a 37 °C, 5% CO₂, em atmosfera úmida por um período *overnight*.

Após 16 horas de incubação, os macrófagos aderidos no fundo da placa foram lavados com PBS e 1 mL de meio de cultura RPMI fresco sem SFB, contendo os microcristais (Tabela A1), foi adicionado aos devidos poços. As células THP-1, por serem cultivadas em suspensão, foram recolhidas em tubo tipo falcon de 15 mL e centrifugadas a $200 \times g$, por 5 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de cada tubo foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI fresco sem SFB, contendo os microcristais (Tabela A1). As suspensões celulares foram devolvidas aos respectivos poços na placa de cultura. As placas foram mantidas em estufa (37 °C, 5% CO₂, atmosfera úmida) por 24 horas.

Tabela A1 - Microcristais e suas respectivas concentrações inibitória (CIM)/fungicida mínimas (CFM)

Microcristal	Concentração (µg/mL)
α -AgVO ₃	3,9 (CIM)* 15,62 (CFM)*
α -Ag ₂ WO ₄	7,81 (CIM/CFM) [†]
β -Ag ₂ MoO ₄	15,62 (CIM/CFM) [¥]

Fonte: Elaborado de acordo com [†] Foggi CC et al.¹, 2017; [¥] Fabbro MT et al.², 2016; *Pimentel BNAS et al.⁶, 2020.

Após 4 e 24 horas de contato das células com os microcristais, alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram recolhidas em microtubos devidamente identificados e estas foram mantidas em freezer - 20 °C para posterior quantificação das citocinas. Após o recolhimento das alíquotas de 24 horas, as células THP-1 foram centrifugadas (400 × *g*, 5 minutos) e ressuspensas em meio RPMI fresco sem SFB. As suspensões celulares foram devolvidas aos seus respectivos poços, e então, 100 µL de solução de alamarBlue™ foram adicionados em cada poço e as placas foram incubadas por mais 4 horas. Já para os macrófagos, após recolher as alíquotas de 100 µL, o restante do sobrenadante foi descartado e 1 mL de meio fresco sem SFB contendo 100 µL de solução de alamarBlue™ foi adicionado em cada poço. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C, 5% de CO₂, em atmosfera úmida por mais 4 horas. Decorrido esse tempo, 4 alíquotas de 200 µL de cada poço foram transferidas para uma placa de 96 poços (Corning, COSTAR, ref. 3916) e foi realizada a leitura de emissão de fluorescência do reagente em leitor de fluorescência (excitação 544 nm; emissão 590 nm; Fluoroskan Ascente II, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Como controle vivo foram utilizadas células em condições padrão de cultivo e como controle de morte foram utilizadas células incubadas com 10 µL de solução tampão de lise (Triton X-100 a 9%). Ainda, foi avaliada a viabilidade das células estimuladas com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS; 1 µg/mL; controle de produção das MMPs), uma vez que o LPS foi utilizado como controle para detecção de MMPs. Para cada condição experimental foi realizado um branco correspondente na ausência de células. Este ensaio foi realizado em quadruplicata e em três ocasiões distintas. Os

resultados obtidos foram normalizados em função dos controles vivos para que pudessem ser classificados com relação à citotoxicidade apresentada de acordo com Lonnroth e Dahl^{7, 8}, 2003, 2001 e Sletten e Dahl⁹, 1999 (Tabela A2).

Tabela A2 - Classificação da citotoxicidade dos tratamentos com relação ao controle negativo

Classificação	% de viabilidade
Não-citotóxico	> 90 %
Levemente citotóxico	60 - 90 %
Moderadamente citotóxico	30 - 60 %
Severamente citotóxico	< 30 %

Fonte: Elaborado de acordo com Lonnroth e Dahl^{7, 8}, 2003, 2001; Sletten e Dahl⁹, 1999.

4 Quantificação de superóxido (O_2^-) intracelular

A produção de O_2^- induzida pelos microcristais nas células THP-1 e macrófago foi identificada a partir do uso do reagente *dihydroethidium* (DHE; D23107; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), uma sonda capaz de identificar seletivamente O_2^- . Neste ensaio, as células foram plaqueadas na concentração de 2×10^4 células/poço em placas de 96 poços contendo solução tampão Krebs-Henseleit (pH $7,0 \pm 0,2$). Em seguida, 200 μ L de DHE (1:1000) foram adicionados em cada poço e as placas foram mantidas em estufa a 37 °C, 5% de CO_2 , em atmosfera úmida por 1 hora. Após este período, os microcristais α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄ foram adicionados nos poços correspondentes e as placas foram incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO_2 , em atmosfera úmida por mais 1 hora. O excesso da sonda foi removido e 100 μ L da solução tampão Krebs-Henseleit foi adicionado em cada poço. A emissão de fluorescência foi detectada com o auxílio de um leitor de fluorescência (Fluostar Omega, BMG Labtech, Cary, NC, EUA; Ex.: 250-10 nm; Em.: 620-10 nm). Células em condição-padrão de cultivo foram utilizadas como controle negativo de produção de superóxido e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2 [0,125 mM]; Sigma-Aldrich, San Luis, MI, EUA) foi utilizado como controle positivo de produção. A N-Acetil-L-cisteína (NAC; [0,01 mM]; Sigma-Aldrich, San Luis, MI, EUA) foi utilizada como *scavenger* a fim de

verificar a especificidade do mecanismo de ação. Esse ensaio foi realizado em quadruplicata e em três diferentes ocasiões.

O O_2^- produzido pelas células expostas aos microcristais também foi identificado por microscopia de fluorescência confocal. Para tanto, as células foram plaqueadas na concentração de 3×10^4 células/poço em placa de 48 poços contendo a solução tampão Krebs-Henseleit, em volume final de 500 μ L. Em seguida, 5 μ L da sonda DHE foram adicionados em cada poço e as células foram incubadas por 1 hora em estufa a 37 °C, 5% de CO_2 , em atmosfera úmida. Decorrido esse período, as células foram expostas aos microcristais α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄ por mais 1 hora em estufa a 37 °C, 5% de CO_2 , em atmosfera úmida. O excesso da sonda foi removido, foram adicionados 500 μ L de solução tampão Krebs-Henseleit em cada poço, e as células foram visualizadas em microscópio de fluorescência confocal. As imagens foram obtidas em Microscópio LSM 800 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) utilizando o laser de 561 nm (detecção de 561 nm até 700 nm) e em campo claro, com auxílio de objetiva de 20x. Células em condição-padrão de cultivo foram utilizadas como controle negativo de produção de superóxido e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2 [0,125 mM]; Sigma-Aldrich, San Luis, MI, EUA) foi utilizado como controle positivo de produção. A N-Acetil-L-cisteína (NAC; [0,01 mM]; Sigma-Aldrich, San Luis, MI, EUA) foi utilizada como *scavenger* a fim de verificar a especificidade do mecanismo de ação.

5 Análise da produção de citocinas inflamatórias por citometria de fluxo

A quantificação das citocinas produzidas pelas células, tanto em monocamada quanto nos modelos de co-cultivo 3D, quando em contato com os microcristais, foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS Aria III, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). A análise de citocinas presentes no meio (sobrenadante) foi realizada com o auxílio do Kit CBA (Cytometric Bead Array System). O CBA é uma técnica desenvolvida pela BD Biosciences para a detecção de citocinas através de *beads* acopladas a fluorocromos. Neste ensaio foi utilizado o Kit *BD™ CBA Human Inflammatory Cytokine* (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, as citocinas inflamatórias humanas, referentes ao padrão liofilizado do kit, foram reconstituídas em 2 mL de *Assay diluent* (tubo denominado “*top standard*”). Em seguida, foi realizada diluição seriada transferindo-se 300 μ L do tubo “*top standard*” para um tubo denominado 1:2 contendo 300 μ L de *Assay diluent*, e assim

por diante, até a diluição 1:256 (pontos da curva-padrão). Um tubo contendo apenas 300 µL de Assay *diluent* foi utilizado como controle negativo do experimento (0 pg/mL). Então, em tubo denominado “*Mixed capture beads*” foram adicionados 10 µL/amostra de cada *bead* de captura presente no Kit. Em seguida, 50 µL de cada ponto da curva-padrão foram adicionados aos seus respectivos tubos de citometria, bem como 50 µL de cada amostra. Então, 50 µL do reagente de detecção, *phycoerythrin* (PE), foi adicionado em cada tubo de citometria e estes foram mantidos protegidos da luz e em temperatura ambiente por 3 horas. Decorrido esse período, 1 mL de *Wash Buffer* foi adicionado em cada tubo e então os tubos foram centrifugados ($200 \times g$, por 5 minutos), os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* ressuspensos em 300 µL de *Wash Buffer*. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACS Aria™ Fusion e os dados foram analisados utilizando o software FACP Array v. 3.1. Para este ensaio, foi realizado um *pool* com os sobrenadantes previamente recolhidos (item 3).

6 Protocolo de estímulo para análise da produção de MMP-8 e -9 através do ensaio de imunoabsorção enzimática (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA)

Para avaliação da produção de MMP-8 e -9 pelas células THP-1 e macrófago, células a partir da 3ª passagem, em meio contendo 5% de SFB, foram plaqueadas em garrafas de 25 cm² na concentração de 5×10^5 células/garrafa e incubadas em estufa a 37 °C, contendo 5% CO₂, em atmosfera úmida por um período *overnight*. Para obtenção dos macrófagos, as células THP-1 plaqueadas em garrafas de 25 cm² (5×10^5 células/garrafa) em volume de 5 mL de meio de cultura foram estimuladas com PMA (5 µL/garrafa) e incubadas em estufa a 37 °C, 5% CO₂, em atmosfera úmida. Após 48 horas, o meio de cultura contendo PMA foi removido, e as células, agora aderentes, foram lavadas com PBS. Meio RPMI-1640 fresco completo, contendo 5% de SFB, foi adicionado em cada garrafa e as células foram mantidas em estufa a 37 °C, 5% CO₂, em atmosfera úmida por um período *overnight*.

Após 16 horas de incubação, os macrófagos aderidos em garrafas foram lavados com PBS e 5 mL de meio RPMI-1640 completo fresco sem SFB, contendo os microcristais (Tabela A1), foram adicionados em cada garrafa. As células THP-1 foram recolhidas em tubo tipo falcon de 15 mL, os poços foram lavados com PBS e o PBS recolhido nos respectivos tubos tipo falcon. Os tubos foram centrifugados a $200 \times g$,

por 10 minutos, em temperatura ambiente. Então, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* de cada tubo foi ressuspenso em 5 mL de meio RPMI fresco sem SFB, contendo os microcristais (Tabela A1), e as suspensões celulares foram devolvidas às respectivas garrafas de 25 cm². As garrafas foram mantidas em estufa (37 °C, 5% CO₂, atmosfera úmida) por 24 horas.

Decorrido esse período, 5 alíquotas de 800 µL do sobrenadante de cada garrafa foram congeladas em freezer a – 20 °C em microtubos de 1,5 mL devidamente identificados. As amostras foram mantidas congeladas até o momento das análises. Como controle positivo, foram utilizadas células estimuladas com 1 µg/mL de LPS^{10, 11}. Este ensaio foi realizado em duplicata e em duas ocasiões distintas.

7 Quantificação das proteínas dos sobrenadantes por *Bradford*

Previamente aos ensaios de ELISA a quantidade total de proteínas em cada amostra foi dosada através do ensaio de *Bradford*, conforme técnica clássica descrita por Bradford¹² (1976). Para tanto, uma alíquota de cada amostra foi descongelada em bancada até atingir a temperatura ambiente. Em microtubos de 1,5 mL estéreis foram confeccionados os pontos da curva-padrão, diluindo-se soroalbumina bovina (*Bovine serum albumine* - BSA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em água MiliQ estéril, de 2,5 µg/mL a 20 µg/mL. Em seguida, os pontos da curva-padrão e as amostras foram aliquotados (500 µL) em placas de 24 poços e incubados com o reagente de *Bradford* (500 µL; Sigma-Aldrich, San Louis MO, EUA) por 5 minutos em temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, alíquotas de 200 µL de cada poço foram transferidas para placas de 96 poços (pontos da curva em duplicata e amostras em triplicata) e foi realizada a leitura da densidade óptica em leitor de ELISA (595 nm; EZ Read 400 Microplate Reader, BioChrom, Cambourne, CAM, Reino Unido). Os dados obtidos foram analisados no Microsoft Excel onde, a partir da curva-padrão obtida, foi possível montar uma equação para calcular a quantidade de proteína em cada amostra. Este ensaio foi realizado numa única ocasião em triplicata.

8 Ensaios de ELISA para detecção de MMP-8 e -9 em sobrenadantes de células após estímulo com microcristais contendo prata

Para a análise da produção de MMP-8 e -9 pelas células, após estímulo com os microcristais contendo prata, foram utilizados os Kits de ELISA da Abcam (MMP-8

Human ELISA Kit; Human MMP-9 SimpleStep ELISA Kit; Abcam, Cambridge, CBE, Reino Unido). Para tanto, foi feito um *pool* de cada grupo, as amostras foram processadas de acordo com as instruções do fabricante e a leitura da densidade óptica foi realizada no aparelho FLUOstar Omega (450 nm; BMG Labtech, Offenburg, BW, Alemanha). Os dados obtidos foram analisados no Microsoft Excel onde, a partir da curva-padrão obtida, foi possível montar uma equação para calcular a quantidade de MMP em cada amostra. O dado final foi normalizado a partir da quantidade de proteína/amostra. Este ensaio foi realizado numa única ocasião em triplicata.

9 Modelo de co-cultivo 3D

Para confecção do modelo de co-cultivo tridimensional (3D) foi realizado o protocolo descrito por Haro Chávez^{13,14}, 2017, 2018 modificado. Brevemente: em tubo tipo falcon de 50 mL foram adicionados 2,3 mL de meio DMEM, 450 µL de SFB, 1,5 mL de colágeno de cauda de rato (First Link, Wolverhampton, WMD, Reino Unido), 200 µL de NaOH (1 M), 250 µL de suspensão celular de FGH a 6×10^5 células/mL e 100 µL de suspensão celular de THP-1 a $1,5 \times 10^6$ células/mL. Esta solução foi cuidadosamente homogeneizada com o auxílio de uma pipeta (para evitar a incorporação de bolhas) e alíquotas de 500 µL foram distribuídas em placa de 24 poços, a qual foi mantida em estufa à 37 °C, com 5 % de CO₂ e em atmosfera úmida até a polimerização do colágeno. Em seguida, 75 µL de células NOK-si na concentração de 2×10^6 células/mL foram pipetadas cuidadosamente em cada poço. A placa foi incubada por 24 horas em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂, em atmosfera úmida para adesão dos queratinócitos à matriz de colágeno.

10 Microscopia de fluorescência confocal dos modelos de co-cultivo 3D não infectados

A microscopia de fluorescência confocal foi utilizada para caracterizar os modelos de co-cultivo 3D desenvolvidos. Para tanto, previamente à confecção dos modelos de co-cultivo 3D, as células THP-1 foram marcadas com *Cell Trace CFSE Cell Proliferation* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) para tornar possível sua identificação no modelo. As células THP-1 foram lavadas duas vezes com 10 mL de PBS (centrifugação a $400 \times g$ por 5 minutos) e ressuspensas em PBS. A concentração celular foi ajustada para $1,5 \times 10^6$ células/mL e, então, foram

adicionados 2 μL de CSFE em cada microtubo, e estes foram incubados por 20 minutos em estufa a 37 °C, com 5% de CO_2 , em atmosfera úmida. Decorrido esse tempo, foram adicionados 20 μL de SFB em cada microtubo, e as amostras foram centrifugadas ($400 \times g$, 3 minutos, 24 °C) e lavadas duas vezes com 1 mL de PBS contendo 2 % de SFB. Finalmente, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio DMEM sem SFB, e então utilizadas para confecção dos modelos de co-cultivo 3D conforme descrito anteriormente (item 9). Para a microscopia de fluorescência confocal, os modelos de co-cultivo 3D foram lavados com PBS e fixados com paraformaldeído (4% v/v) por 30 minutos em estufa a 37 °C, com 5% de CO_2 , em atmosfera úmida. Em seguida foi realizada permeabilização dos modelos 3D com uma solução de triton X-100 à 0,1 % (surfactante) por 10 minutos, em temperatura ambiente, seguida por duas lavagens com PBS e posterior marcação com Faloidina (*ActinRedTM 555 ReadyProbesTM reagent* - ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) por 30 minutos em estufa a 37 °C, com 5% de CO_2 , em atmosfera úmida, para marcação do citoesqueleto. Os modelos foram lavados com PBS para remoção do excesso do marcador. Para aquisição das imagens foi utilizado o Microscópio LSM 800 com os lasers de 488 nm e 561 nm.

Para os modelos de co-cultivo 3D expostos aos microcristais $\alpha\text{-AgVO}_3$, $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ e $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$, previamente a marcação, alíquotas de 100 μL do sobrenadante foram armazenadas em microtubos devidamente identificados e estes foram mantidos em freezer - 20 °C para posterior quantificação das citocinas. Em seguida, 500 μL de Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo (1:1000; Sigam-Aldrich, San Louis, MO, EUA) foram adicionados a cada modelo de co-cultivo 3D e estes foram incubados por 10 minutos, em temperatura ambiente e protegidos da luz. Decorrido esse tempo, os modelos de co-cultivo 3D foram lavados com PBS e fixados com 300 μL de paraformaldeído (4% v/v) em estufa a 37 °C, com 5% de CO_2 , em atmosfera úmida. Após 20 minutos, os modelos foram lavados com PBS, permeabilizados com triton X-100 a 0,1% por 10 minutos em temperatura ambiente, e novamente lavados com PBS. Após a lavagem foi realizada a marcação com 300 μL de Faloidina (Alexa-488 Phalloidin, ThermoFischer Scientific, MA, EUA) e os modelos foram incubados por 30 minutos em estufa a 37 °C, com 5% de CO_2 , em atmosfera úmida. Finalmente, os modelos foram lavados com PBS e analisados no microscópio de fluorescência confocal (LSM 800). Para aquisição das imagens foram utilizados os lasers 405 e 488 (emissão até 530 nm e acima de 575 nm) nos eixos X, Y e Z.

11 Ensaio de citotoxicidade nos modelos de co-cultivo 3D não infectados

Para avaliar a citotoxicidade de α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄, foi realizada a exposição dos modelos de co-cultivo 3D aos microcristais nas concentrações de interesse (Tabela A1) por 24 horas. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de MTT por *tetrazolium salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (MTT; Sigma-Aldrich, San Louis, MO, EUA), conforme descrito anteriormente por Dias et al.¹⁵ (2017). Brevemente, o meio de cultura foi removido dos poços e os modelos de co-cultivo 3D foram lavados com PBS. Em seguida, 400 μ L de MTT diluído em RPMI sem vermelho de fenol (2 mg/mL) foram adicionados em cada poço contendo os modelos de co-cultivo, e as placas foram incubadas em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂, em atmosfera úmida. Após 4 horas, os modelos foram transferidos para tubos do tipo falcon de 15 mL contendo 2 mL de álcool isopropílico e foram vortexados por 1 minuto para que houvesse a solubilização dos cristais de formazan. Então, alíquotas de 200 μ L foram transferidas para uma placa de 96 poços e foi realizada a leitura da absorbância em 562 nm no leitor de placa EZ Read 400 Microplate reader (BioChrom) com o auxílio do software Adapt 2.0 (BioChrom). Esse ensaio foi realizado em triplicata e em três ocasiões diferentes.

12 Microrganismo, condições de cultivo e infecção do modelo de co-cultivo 3D

Para realizar a infecção do modelo de co-cultura 3D, a cepa padrão de *Candida albicans* (American Type Culture Collection - ATCC 90028) foi utilizada. Para tanto, o microrganismo, que se encontrava congelado em freezer – 80 °C, foi reativado em placa de petri contendo *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA; Kasvi; São José dos Pinhais, PR, Brasil) e mantido em estufa estática a 37 °C para que houvesse o crescimento de colônias. Para formação do pré-inóculo, 5 colônias foram transferidas para um tubo tipo falcon contendo 10 mL de meio de cultura *Yeast Nitrogen Base* (YNB; BD Difco, San Jose, CA, EUA) suplementado com 100 mM de glicose. O conteúdo foi homogeneizado com auxílio de um vórtex de bancada e o tubo foi mantido em estufa estática a 37 °C. Após 16 horas, o pré-inóculo foi diluído na proporção 1:20 em meio YNB fresco e então incubado por mais 8 horas em estufa a 37 °C para que atingisse a fase *mid-log* de crescimento do microrganismo, formado assim o inóculo de *C.*

albicans. Após o crescimento, as células de *C. albicans* foram lavadas duas vezes com 10 mL de PBS por centrifugação à 4000 rpm (4 °C, 10 minutos) e ressuspensas em meio RPMI-1640 tamponado com HEPES (25 mM), 2 mM de L-glutamina e bicarbonato de sódio (2 g/L)¹⁶. A suspensão celular de *C. albicans* ($2-5 \times 10^6$ UFC/mL) foi diluída seriadamente até uma concentração de aproximadamente 3×10^4 UFC/mL, e então 100 µL desta suspensão foram cuidadosamente inoculados no topo de cada modelo de co-cultivo 3D e estes foram mantidos em estufa a 37 °C por um período 24 horas.

13 Avaliação da atividade antifúngica dos microcristais

Para avaliar a atividade antifúngica dos microcristais de α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄, sobre biofilmes de *C. albicans* formados sobre os modelos de co-cultivo 3D, foi realizado o plaqueamento e contagem de colônias viáveis (UFC/mL), bem como microscopia de fluorescência confocal. Para tanto, após infecção e desafio com os microcristais, os modelos de co-cultivo 3D foram recolhidos, transferidos para tubos do tipo falcon de 15 mL contendo 1 mL de PBS e vortexados por 5 minutos. Então, foram coletados 100 µL e realizada a diluição seriada seguida por plaqueamento em placas de petri contendo meio SDA. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C por 24 horas e, então, foi realizada a contagem de colônias. O fármaco fluconazol à 120 µg/mL (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, EUA) foi utilizado como controle padrão de tratamento. Esse experimento foi realizado em triplicata e em cinco ocasiões distintas.

O efeito antifúngico dos microcristais sobre o biofilme de *C. albicans* cultivado nos modelos de co-cultivo 3D também foi avaliado por microscopia de fluorescência confocal utilizando o marcador *LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit* (Molecular Probes, OR, EUA). Brevemente, após coletar e vortexar os modelos de co-cultivo 3D conforme descrito anteriormente, uma alíquota de cada grupo experimental foi marcada com iodeto de propídeo e Syto9 (1:1000) diluídos em PBS. Então, 1 mL de cada amostra foi transferido para uma placa de confocal e esta foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz. As amostras foram, então, centrifugadas ($1610 \times g$, 10 minutos) e os *pellets* ressuspensos em PBS. Em seguida, foram obtidas as imagens no Microscópio LSM 800 utilizando o laser 488 nm. O fármaco fluconazol à 120 µg/mL (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, EUA) foi utilizado

como controle padrão. Esse experimento foi realizado em duplicata e em duas ocasiões distintas.

14 Microscopia de fluorescência confocal dos modelos de co-cultivo 3D infectados

Para a análise dos modelos de co-cultivo 3D infectados por *C. albicans* foi realizada microscopia de fluorescência confocal. Para tanto, previamente à confecção dos modelos, as células THP-1 foram marcadas com CFSE conforme descrito anteriormente (item 9). Após a marcação com Faloidina (*ActinRed*TM), 20 µL de CalcoFluor White (CW; Sigma-Aldrich, San Louis, MO, EUA) e 20 µL de KOH (10 % v/v) foram adicionados em cada poço contendo os modelos de co-cultivo 3D infectados por *C. albicans*. Após 10 minutos, os modelos foram lavados com PBS e em seguida foram analisados em microscópio de fluorescência confocal (LSM 800). Para a aquisição das imagens foram utilizados os lasers 405 nm, 488 nm e 561 nm.

Para análise dos modelos infectados e expostos aos microcristais α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄ e β -Ag₂MoO₄, após 24 horas de contato, 500 µL de iodeto de propídeo (1:1000) foram adicionados em cada poço contendo os modelos. Após 10 minutos, os modelos foram lavados com PBS, fixados com paraformaldeído (4 % v/v) e mantidos em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂, em atmosfera úmida por 20 minutos. Então, foi realizada uma lavagem com PBS, 300 µL de Triton X-100 a 0,1% foram adicionados e os modelos foram incubados em estufa a 37 °C por 10 minutos. Os modelos foram novamente lavados com PBS e, então, marcados com Faloidina (Alexa-488 *Phalloidin*TM, ThermoFischer Scientific, MA, EUA). Após 30 minutos, os modelos foram finalmente lavados com PBS e levados para análise em microscópio de fluorescência confocal (LSM 800). Para a aquisição das imagens foram utilizados os lasers de 405 nm e 488 nm nos eixos X, Y e Z.

15 Análise estatística

Os resultados obtidos a partir dos ensaios de viabilidade celular (alamarBlueTM e MTT), produção de superóxido e atividade antifúngica foram submetidos à análise de normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Teste de Levene). Como foram considerados normais e homocedásticos, os resultados de viabilidade celular e de produção de superóxido foram submetidos ao

teste estatístico de análise de variância a um fator (ANOVA *one way*) seguidos do pós-teste de Tukey. Já os resultados obtidos a partir do ensaio de atividade antifúngica foram considerados não normais e, portanto, foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Para análise dos resultados de produção de citocinas pró-inflamatórias, os dados obtidos foram inicialmente analisados no software *FCAP Array* (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Posteriormente, os valores de intensidade de fluorescência média das citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células em monocamada e os valores de absorbância das MMPs foram analisados a partir da inferência estatística com intervalo de confiança de 95 % (IC95). Já para os dados obtidos a partir dos sobrenadantes dos modelos de co-cultivo 3D com o ensaio de CBA, foi realizado teste T de *Student*. Para a análise estatística dos dados foram utilizados os softwares estatísticos SPSS (IBM) e GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, CA, EUA). Foi adotado um nível de significância de 5 %.

REFERÊNCIAS*

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Castilho RM, Squarize CH, Leelahavanichkul K, Zheng Y, Bugge T, Gutkind JS. Rac1 is required for epithelial stem cell function during dermal and oral mucosal wound healing but not for tissue homeostasis in mice. *PLoS ONE.* 2010; 5(5): e10503.
5. Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res.* 2007; 56(1): 45–50.

* 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>

6. 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.
7. Lönnroth EC, Dahl JE. Cytotoxicity of liquids and powders of chemically different dental materials evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. *Acta Odontol Scand*. 2003; 61: 52–6.
8. Lönnroth EC, Dahl JE. Cytotoxicity of dental glass ionomers evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. *Acta Odontol Scand*. 2001; 59: 34–9.
9. Sletten GBG, Dahl JE. Cytotoxic effects of extracts of compomers. *Acta Odontol Scand*. 1999; 57: 316–22.
10. Chellat F, Grandjean-Laquerriere A, Naour RL, Fernandes J, Yahia L, Guenounou M et al. Metalloproteinase and cytokine production by THP-1 macrophages following exposure to chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials*. 2005; 26(9): 961–70.
11. 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.
12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248–54.
13. 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.
14. 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.
15. Dias KC, Barbugli PA, Patto F, Lordello VB, Penteado LA, Medeiros AI et al. Soluble factors from biofilm of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* promote cell death and inflammatory response. *BMC Microbiol*. 2017; 17(1): 146.
16. Dias KC, Barbugli PA, Vergani CE. Influence of different buffers (HEPES/MOPS) on keratinocyte cell viability and microbial growth. *J Microbiol Methods*. 2016; 125: 40–2.

ANEXO A – Permissão das revistas para publicação dos artigos no repositório Unesp

Toxicology Letters

Toxicology Letters

Publication Information	
Title	Toxicology Letters (English)
ISSNs	Print: 0378-4274
URL	http://www.elsevier.com/wps/product/cws_home/505519/description
Publishers	Elsevier [Commercial Publisher] EUROTOX [Associate Organisation]
Publisher Policy	
Open Access pathways permitted by this journal's policy are listed below by article version. Click on a pathway for a more detailed view.	
Published Version (pathway a)	 PMC, Non-Commercial Repository, Research for Development Repository, +2
Published Version (pathway b)	 Institutional Repository, Subject Repository, PMC, Research for Development Repository, +2
OA Fee	This pathway has an Open Access fee associated with it
OA Publishing	This pathway includes Open Access publishing
Embargo	No Embargo
Licence	CC BY
Location	Institutional Repository Named Repository (PubMed Central, Research for Development Repository, ESRC Research Catalogue) Subject Repository Journal Website
Conditions	Published source must be acknowledged with citation
Published Version (pathway c)	 Institutional Repository, Subject Repository, PMC, Research for Development Repository, +2
Accepted Version (pathway a)	 Author's Homepage
Accepted Version (pathway b)	12m Non-Commercial Institutional Repository, Subject Repository
Embargo	12 Months
Licence	CC BY-NC-ND
Location	Non-Commercial Institutional Repository Subject Repository
Conditions	Must link to publisher version with DOI

Frontiers in Biotechnology and Bioengineering

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology

Publication Information

Title

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology (English)

ISSNs

Electronic: 2296-4185

URL

http://frontiersin.org/Bioengineering_and_Biotechnology

Publishers

Frontiers Media [Commercial Publisher]

DOAJ Listing

<https://doaj.org/toc/2296-4185>

Requires APC

Yes (Data provided by DOAJ)

Publisher Policy

Open Access pathways permitted by this journal's policy are listed below by article version. Click on a pathway for a more detailed view.

Published Version

None

CC BY

PMC

Any Repository, Journal Website, +1

OA Publishing

This pathway includes Open Access publishing

Embargo

No Embargo

Licence

CC BY 4.0

Copyright Owner

Authors

Publisher Deposit

PubMed Central

Location

Any Repository
Named Repository (PubMed Central)
Journal Website

Conditions

Published source must be acknowledged with citation
Copyright must be acknowledged
First publication by Frontiers Media must be acknowledged
Must link to published article

Accepted Version

None

CC BY

Any Repository, arXiv, +3

Embargo

No Embargo

Licence

CC BY 4.0

Copyright Owner

Authors

Location

Any Repository
Named Repository (arXiv, PeerJ Preprints, OSF)
Preprint Repository

Conditions

Published source must be acknowledged with citation
Copyright must be acknowledged
First publication by Frontiers Media must be acknowledged

Não autorizo a reprodução deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a defesa.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 10 de fevereiro de 2022

Bruna Natália Alves da Silva Pimentel