

GABRIELLA SALES CALAÇO ROQUE

Estudo da ação antitumoral de nanopartículas de prata biogênicas

São Paulo

2023

Estudo da ação antitumoral de nanopartículas de prata biogênicas

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres (PPGAADS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Olímpia de Souza

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Catálogo na Publicação

Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo
Ficha catalográfica gerada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Roque, Gabriella
Estudo da ação antitumoral de nanopartículas de prata biogênicas
/ Gabriella Roque ; orientador Ana Olívia de Souza - versão
corrigida.-- São Paulo, 2023.
79 f. : il.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos
Animais Domésticos e Silvestres - Departamento de Cirurgia) -
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São
Paulo, 2023.

1. AgNPs. 2. Fungos. 3. Aspergillus tubingensis. 4.
Citotoxicidade. 5. MDA-MB-231. I. Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura de catalogação
na publicação: Maria Aparecida Laet - CRB 5673-8.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da ação antitumoral de nanopartículas de prata biogênicas", protocolada sob o CEUA nº 6869140120 (ID 008475), sob a responsabilidade de **Ana Olívia de Souza e equipe; Gabriella Sales Calação Roque; Dr Durvanei Augusto Maria; Usama Bilal Anwar** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 22/10/2020.

We certify that the proposal "Study of antitumor action of biogenic silver nanoparticles", utilizing 120 Isogenics mice (males or females), protocol number CEUA 6869140120 (ID 008475), under the responsibility of **Ana Olívia de Souza and team; Gabriella Sales Calação Roque; Dr Durvanei Augusto Maria; Usama Bilal Anwar** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/22/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 10/2020 a 10/2024 Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Origem: **Instituto Butantan**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos ou Fêmeas** idade: **6 a 8 semanas** Quantidade: **120**

Linhagem: **C57BL/6J**

Peso: **10 a 25 g**

São Paulo, 19 de abril de 2023

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da ação antitumoral de nanopartículas de prata biogênicas", protocolada sob o CEUA nº 5593210220 (ID 002071), sob a responsabilidade de **Ana Olívia de Souza e equipe; Gabriella Sales Calaço Roque; Usama Bilal Anwer; Durvanei Augusto Maria** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 23/04/2020.

We certify that the proposal "Study of antitumor action of biogenic silver nanoparticles ", utilizing 120 Isogenics mice (120 males), protocol number CEUA 5593210220 (ID 002071), under the responsibility of **Ana Olívia de Souza and team; Gabriella Sales Calaço Roque; Usama Bilal Anwer; Durvanei Augusto Maria** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 04/23/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [06/2020](#) a [06/2024](#) Área: [Biologia Molecular](#)

Origem: [Biotério Central](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [6 a 8 semanas](#)

N: [120](#)

Linhagem: [C57BL/6](#)

Peso: [10 a 25 g](#)

Local do experimento: Unidade de experimentação clínica do Laboratório de Desenvolvimento e Inovação Instituto Butantan

São Paulo, 23 de abril de 2020



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ROQUE, Gabriella Sales Calaço

Título: **Estudo da ação antitumoral de nanopartículas de prata biogênicas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres (PPGAADS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À Deus, em primeiro lugar.

Ao meu esposo Willian Inácio Roque.

Aos meus pais, Verônica Moraes de Sales e Gildo Nascimento Calaço.

Aos meus irmãos, Glauco Sales N. Calaço, Gláucia Sales N. C. Lima e Joyce Sales C. Cerilo.

A todos os professores que me auxiliaram a chegar até aqui, com especial carinho ao meu professor de História do ensino fundamental II, Eduardo Nunes de Andrade, e aos meus professores do ensino superior, Dr. Frank Viana Carvalho, Dr. Flávio Trevisan, Dr. Sandro José Conde e a Dra. Jaqueline Carlos Bender.

Ao meu amigo, companheiro de pesquisa, Luiz Gustavo Ribeiro.

À minha orientadora Dra. Ana Olívia de Souza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a primeiramente a Deus que me deu suporte espiritual e material durante os anos de desenvolvimento deste projeto, e a pessoas especiais que me auxiliaram, a começar pela minha família, pai, mãe e irmãos que apesar das minhas muitas ausências sempre compreenderam meu esforço e me apoiaram, e principalmente ao meu esposo Willian pelo companheirismo e paciência que foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

Deus coloca pessoas em momentos oportunos para que suas promessas sejam cumpridas na Terra. Por esse motivo também agradeço a todas as pessoas do grupo de pesquisa do Laboratório de Desenvolvimento e Inovação do Instituto Butantan, e a minha orientadora Dra. Ana Olívia pelo auxílio e ensinamentos.

Aos demais, que participaram, apoiaram ou tiveram uma palavra amiga, deixo aqui meus sinceros agradecimentos, pois vocês foram essenciais para meu crescimento pessoal e profissional. Muitas pessoas passam por nossa vida, mas poucas são especialmente importantes, por isso agradeço a todos vocês que por livre escolha foram gentis.

Agradeço, também, aos grupos de pesquisas que de alguma forma contribuíram para conclusão desse projeto, as equipes técnicas do Instituto Butantan e ao suporte acadêmico do Departamento de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). À Fapesp pelo financiamento da pesquisa e bolsa de doutorado direto Processo 2020/04799-7, que foram indispensáveis para o desenvolvimento da pesquisa.

“Ai de vós, quando todos os homens vos
louvarem, porque assim faziam os seus pais
aos falsos profetas!”

(BÍBLIA, Lucas 6:26)

RESUMO

ROQUE, GSC. Estudo da ação antitumoral de nanopartículas de prata biogênicas. 2023. 71 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Dados da literatura evidenciam promissoras propriedades antitumorais de nanopartículas de prata (AgNPs) de origem biológica que representam uma nova alternativa para o tratamento do câncer. Com esta perspectiva, neste estudo, sete AgNPs micogênicas foram obtidas utilizando as espécies de fungos *Aspergillus tubingensis* (AgNP-AT), *Aspergillus* spp. (AgNP-Asp), *Bionectria ochroleuca* (AgNP-BO), *Cladosporium pini-ponderosae* (AgNP-CPP), *Fusarium proliferatum* (AgNP-FP), *Epicoccum nigrum* (AgNP-EN) e *Exserohilum rostratum* (AgNP-ER). As AgNPs foram caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS), índice de polidispersão (PDI), potencial Zeta (PZ), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), e apresentaram forma esférica e tamanho de 21,8 a 35,8 nm. A citotoxicidade das AgNPs foi avaliada em células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231), células de câncer de pâncreas (MIA PaCa-2), e células normais de fibroblastos humanos (FN1) pelo ensaio de MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) nos tempos de 24, 48 e 72 h. Os valores das concentrações efetivas em inibir 50% da proliferação celular em células tumorais foram definidos como correspondentes ao IC50 e em células normais como CC50. Em 48 h, as AgNP-BO, AgNP-AT, e AgNP-Asp demonstraram alta citotoxicidade para as células MDA-MB-231, com IC50 de 0,0016; 0,0025; e 0,0253 mM, respectivamente, enquanto apresentaram baixa citotoxicidade para as células FN1, com CC50 de 0,0982; 0,2130, e 1,3190 mM. Os valores de IC50 e CC50 foram utilizados para calcular o índice de seletividade das AgNPs ($IS = CC50/IC50$) em 48 h, sendo 85,20; 61,38 e 52,13 para AgNP-AT, AgNP-BO e AgNP-Asp, indicando a especificidade das AgNPs pelas células tumorais. Considerando a alta especificidade das AgNP-AT pelas células MDA-MB-231, a ação dessas nanopartículas foi também avaliada nas fases do ciclo celular, na proliferação celular, na indução de apoptose e na mutagenicidade. A 0,03 mM as AgNP-AT induziram parada do ciclo celular na fase S, aumento de apoptose em 1,7 vezes e ausência de danos aos cromossomos de células V79-4. Os dados comprovam a citotoxicidade e especificidade das AgNP-AT para células tumorais MDA-MB-231, com IS de 85,20, indicando baixa toxicidade para células normais.

Palavras-chave: AgNPs. Fungos. *Aspergillus tubingensis*. Citotoxicidade. MDA-MB-231.

ABSTRACT

ROQUE, GSC. **Study of the antitumor action of biogenic silver nanoparticles**. 2023. 71 f. Thesis (Doctorate in Sciences) – College of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, 2023.

Data from the literature show promising antitumor properties of silver nanoparticles (AgNPs) of biological origin that represent a new alternative for the treatment of cancer. With this perspective, in this study, seven mycogenic AgNPs were obtained using the fungal species *Aspergillus tubingensis* (AgNP-AT), *Aspergillus* spp. (AgNP-Asp), *Bionectria ochroleuca* (AgNP-BO), *Cladosporium pini-ponderosae* (AgNP-CPP), *Fusarium proliferatum* (AgNP-FP), *Epicoccum nigrum* (AgNP-EN) e *Exserohilum rostratum* (AgNP-ER). The AgNPs were characterized by dynamic light scattering (DLS), polydispersion index (PDI), Zeta potential (PZ), transmission electron microscopy (TEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and showed spherical shape and size from 21.8 to 35.8 nm. Cytotoxicity of AgNPs was evaluated in breast cancer cells (MCF-7 and MDA-MB-231), pancreas cancer cells (MIA PaCa-2), and normal human fibroblast cells (FN1) by MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay at times of 24, 48, and 72 h. The values of concentrations effective in inhibiting 50% of cell proliferation in tumor cells were defined as corresponding to IC₅₀ and in normal cells as CC₅₀. In 48 h, AgNP-BO, AgNP-AT, and AgNP-Asp demonstrated high cytotoxicity for MDA-MB-231 cells, with IC₅₀ of 0.0016; 0.0025; and 0.0253 mM, respectively, while showing low cytotoxicity for FN1 cells, with a CC₅₀ of 0.0982; 0.2130, and 1.3190. IC₅₀ and CC₅₀ values were used to calculate the AgNPs selectivity index (SI = CC₅₀/IC₅₀) in 48 h, being 85.20; 61.38 and 52.13 for AgNP-AT, AgNP-BO and AgNP-Asp, indicating the specificity of AgNPs for tumor cells. Considering the high specificity of AgNP-AT for MDA-MB-231 cells, its action was also evaluated in the cell cycle phases, cell proliferation, induction of apoptosis and mutagenicity. At 0.03 mM, AgNP-AT induced cell cycle arrest in the S phase, a 1.7-fold increase in apoptosis and no damage to the chromosomes of V79-4 cells. The data confirm the cytotoxicity and specificity of AgNP-AT for MDA-MB-231 tumor cells, with an SI of 85.20, indicating low toxicity for normal cells.

Keywords: AgNPs. Fungi. *Aspergillus tubingensis*. Cytotoxicity. MDA-MB-231.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Gráficos de citotoxicidade das nanopartículas AgNP-AT, AgNP-BO, AgNP-ER e AgNP-FP em células tumorais MIA PaCa-2 e fibroblastos humanos normais (FN1) após tratamentos em 24 h.....39
- Figura 2- Gráficos de citotoxicidade das nanopartículas AgNP-AT, AgNP-BO, AgNP-ER e AgNP-FP em células tumorais MCF-7e fibroblastos humanos normais (FN1) após tratamentos em 24 h40
- Figura 3- Representação gráfica da viabilidade de células tumorais MDA-MB-231 e fibroblastos humanos normais (FN1) após tratamentos com AgNP-AT, AgNP-BO, AgNP-CPP e AgNP-ER por 24, 48 e 72 h.....42
- Figura 4- Representação gráfica da viabilidade de células tumorais MDA-MB-231 e células fibroblásticas humanas normais (FN1) após tratamentos com AgNP-EN, AgNP-FP, AgNP-Asp e cisplatina, em 24, 48 e 72 h.....43
- Figura 5- Representação gráfica da porcentagem de distribuição das células normais FN1 nas diferentes fases do ciclo celular (G0/G1, S, G2M, DNA fragmentado) nos tempos de 24, 48 e 72 h após tratamento com as AgNP-AT ou cisplatina.....46
- Figura 6- Histogramas representativos da distribuição dos fibroblastos normais FN1 nas diferentes fases do ciclo celular nos tempos de 24, 48 e 72 h após tratamento com as AgNP-AT a 0,015; 0,03 e 0,06 mM (D-L), ou com cisplatina a 0,038; 0,076 e 0,152 mM (M-U) e o grupo controle (A, B e C)47
- Figura 7- Representação gráfica da distribuição das células tumorais MDA-MB-231 nas diferentes fases do ciclo celular (G0/G1, S, G2M, DNA fragmentado) nos tempos 24, 48 e 72 h após tratamento com as AgNP-AT ou com cisplatina48
- Figura 8- Histogramas representativos da distribuição das células tumorais MDA-MB-231 nas diferentes fases do ciclo celular nos tempos de 24, 48 e 72 h após tratamento com as AgNP-AT a 0,015; 0,03 e 0,06 mM (D-L), ou com cisplatina a 0,038; 0,076 e 0,152 mM (M-U) e o grupo controle (A, B e C)49
- Figura 9- Gráfico do índice de proliferação das células (A) FN1 e (B) MDA-MB-231, tratadas com AgNP-ATou cisplatina50
- Figura 10- Histogramas representativos da proliferação celular dos Fibroblastos normais no tempo de 24 h após tratamento com as AgNP-AT a 0,015; 0,03 e 0,06 mM ou com cisplatina a 0,038; 0,076 e 0,152 mM e o grupo controle.....51
- Figura 11- Histogramas representativos da proliferação celular das células tumorais MDA-MB-231 no tempo de 24 h após tratamento com as AgNP-AT a 0,015;

0,03 e 0,06 mM ou com cisplatina a 0,038; 0,076 e 0,152 mM e o grupo controle 52

Figura 12- Porcentagem de células viáveis, em necrose e em apoptose precoce ou tardia. Células MDA-MB-231 (A, C) ou FN1 (B, D) após tratamento com AgNP-AT ou cisplatina 54

Figura 13- Representação da análise de mutagênese em células V79-4. Micrografias de células coradas com Giemsa a 5% para os grupos tratados com AgNP-AT (C) a 0,03 mM, metanossulfonato de metila (MMS), e controle não tratado (F) 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Concentrações que inibem 50% da proliferação das células tumorais MIA PaCa-2 e MCF-7 (IC50), de células normais FN1 (CC50) em 24 h, e valores dos índices de seletividade (IS).	38
Tabela 2-	Concentrações de AgNPs (mM) que inibem 50% do crescimento de células tumorais MDA-MB-231 (IC50) e de fibroblastos humanos normais (FN1) (CC50). Valores do índice de seletividade (IS= CC50/IC50).	44
Tabela 3-	Marcação com anexina V/PI em fibroblastos normais FN1e células tumorais MDA-MB-231 tratadas com AgNP-AT.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	Extrato aquoso
AgNO ₃	Nitrato de prata
AgNP ^{Efetiva}	Nanopartícula de prata efetiva
AgNP- EN	Nanopartícula de prata biossintetizada utilizando o fungo <i>Epicoccum nigrum</i>
AgNP-Asp	Nanopartícula de prata biossintetizada utilizando o fungo <i>Aspergillus</i> spp
AgNP-AT	Nanopartícula de prata biossintetizada utilizando o fungo <i>Aspergillus tubingensis</i>
AgNP-BO	Nanopartícula de prata biossintetizada utilizando o fungo <i>Bionectria ochroleuca</i>
AgNP-CPP	Nanopartícula de prata biossintetizada utilizando o fungo <i>Cladosporium pini-ponderosae</i>
AgNP-ER	Nanopartícula de prata biossintetizada utilizando o fungo <i>Exserohilum rostratum</i>
AgNP-FP	Nanopartícula de prata biossintetizada utilizando o fungo <i>Fusarium proliferatum</i>
AgNPs	Nanopartículas de prata
APR	Aumento da permeabilidade e retenção
ATM	Ataxia-telangiectasia mutada
ATR	Ataxia-telangiectasia e relacionada a Rad3
AuNPs	Nanopartícula de ouro
BD	Batata dextrose
BDA	Batata dextrose ágar
CC50	Concentração que inibe a proliferação celular em 50%
CENARGEN	Coleção de Microrganismos para Biocontrole de Fitopatógenos e Plantas Daninhas” da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
CFSE	Ester de carboxi-fluoresceína diacetato succinimidil
CIM	Concentração inibitória mínima
CO ₂	Dióxido de carbono
CT ^{alvo}	Célula tumoral alvo
DLS	Dynamic Light Scattering
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GAS5	RNAs não codificantes longos
HOTAIR	RNAs não codificantes longos
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IC50	Concentração que inibe a proliferação celular em 50%
ICP OES	Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente
IDH	Índice de desenvolvimento humano
IOC	Instituto Oswaldo Cruz

IS	Índice de seletividade
lncRNAs	RNAs não codificantes longos
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
miRNAs	MicroRNAs
NPMs	Nanopartículas metálicas
oncomiRNAs	miRNAs promotores de tumor
PANDAR	RNAs não codificantes longos
PBS	Tampão fosfato de sódio
PDI	Índice de polidispersão
PI	Iodeto de propídio
PI3K/Akt	Enzima fosfatidilinositol-3-cinase
ROS	Espécie reativa de oxigênio
RPS	Ressonância plasmônica de superfície
SFB	Soro fetal bovino
SPRY4-IT1	RNAs não codificantes longos
TNBC	Câncer de mama triplo negativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 CÂNCER E TRATAMENTOS DISPONÍVEIS.....	20
2.1.1 CÂNCER TNBC E ESTRATÉGIAS PARA O TRATAMENTO	24
2.2 NANOPARTÍCULAS DE PRATA E AÇÃO ANTITUMORAL	25
2.3 APLICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS NA BIOSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	28
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 ESPÉCIES FÚNGICAS E LINHAGENS CELULARES	31
4.2 BIOSÍNTESE DAS AgNPS E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	31
4.3 AVALIAÇÃO DA AÇÃO CITOTÓXICA DAS AGNPS POR ENSAIO DE MTT	32
4.4 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	33
4.5 DETERMINAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	35
4.6 INDUÇÃO DE APOPTOSE/NECROSE - MARCAÇÃO COM ANEXINA V / IODETO DE PROPÍDEO	35
4.7 ENSAIO DE MUTAGÊNESE CROMOSSÔMICA	36
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
5 RESULTADOS	37
5.1 BIOSÍNTESE DAS AgNPS E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	37
5.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS AGNPS POR ENSAIO DE MTT	38
5.3 CITOTOXICIDADE DAS AgNP EM CÉLULAS MDA-MB-231	41
5.4 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	44
5.5 DETERMINAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	50
5.6 INDUÇÃO DE APOPTOSE/NECROSE - MARCAÇÃO COM ANEXINA V/ IODETO DE PROPÍDEO	53
5.7 ENSAIO DE MUTAGÊNESE CROMOSSÔMICA	54
6 DISCUSSÃO	57
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o estudo da aplicação de nanopartículas metálicas (NPMs) em cosméticos, embalagens, vacinas, diagnósticos e tratamentos foi ampliado e tem demonstrado excelentes resultados (NAJAH-MISSAOUI; ARNOLD; CUMMINGS, 2021).

As características intrínsecas dos materiais metálicos nanoparticulados, relativas à superfície, volume, propriedades físico-químicas, elétricas, magnéticas, biológicas e catalíticas conferem multipotencialidade destes materiais em diferentes setores, especialmente na área de saúde humana (NAJAH-MISSAOUI; ARNOLD; CUMMINGS, 2021; SHAH et al., 2021).

Dentre as diversas nanopartículas metálicas, a de prata (AgNP) é amplamente utilizada. Isso se deve as suas propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas no combate a micro-organismos patogênicos, como vírus, bactérias e fungos. Além disso, a produção em escala nanométrica é relativamente simples, possibilitando a aplicação em diversos produtos médicos, como curativos, revestimentos de implantes e sistemas de liberação controlada (XU et al., 2020).

As NPMs podem ser obtidas por métodos físicos, químicos e biológicos. O método biológico apresenta vantagens em relação a sustentabilidade e a obtenção de NPs com tamanhos menores. No entanto, as propriedades físico-químicas das NPMs obtidas por este método podem variar de acordo com a espécie de micro-organismo utilizado, incluindo diferenças na composição da camada proteica externa, de difícil caracterização pela diversidade de metabólitos secretados por micro-organismos (BARABADI et al., 2019).

Nosso grupo demonstrou que AgNPs biogênicas obtidas a partir dos fungos *B. ochroleuca* (AgNP-BO) e *A. tubingensis* (AgNP-AT), ambas com tamanho de 35 ± 10 nm, apresentam expressiva ação antibacteriana sobre *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, incluindo a inibição da formação de biofilme por *P. aeruginosa*. Essas AgNPs inibiram o crescimento de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*, que são espécies de leveduras clinicamente relevantes. Excelente ação antimicrobiana também foi observada quando essas AgNPs foram incorporadas em tecidos de poliéster e de algodão (RODRIGUES et al., 2013, 2019).

Recentemente, as AgNP-AT, AgNP-Asp, AgNP-BO, AgNP-CPP, AgNP-EN, AgNP-ER e AgNP-FP foram obtidas utilizando as espécies de fungos *A. tubingensis*, *Aspergillus* spp, *Bionectria ochroleuca*, *Cladosporium pini-ponderosae*, *Epicoccum nigrum*, *Exserohilum rostratum* e *Fusarium proliferatum*, respectivamente. Essas nanopartículas com tamanho variando de 43.4 a 120.6 nm medido pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering* - DLS) e de 21.8 a 35.8 nm por microscopia eletrônica de transmissão (MET), e potencial Zeta negativo, apresentaram promissora ação antimicrobiana em diferentes espécies

de *Candidas*, comuns em infecções hospitalares com concentrações inibitórias mínima (CIM) de 1,25 a 40 μM , e contra fitopatógenos responsáveis por causar sérios danos à produção agrícola com CIM de 4 a 250 μM (RIBEIRO et al., 2023).

O tamanho em escala nanométrica confere vantagens aos materiais metálicos para aplicações biológicas, entretanto o reduzido tamanho pode ser um problema ambiental devido à alta reatividade e potencial de dispersão no ar, deposição em corpos d'água e penetração em diferentes tipos de superfícies e ambientes (ARUOJA et al., 2009; SANTOS, 2010). Além disso, o ciclo comercial dos produtos contendo NPMs devem ser cautelosamente planejados para não vir a se tornar um problema socioambiental em um futuro próximo.

No entanto, os dados obtidos por nosso grupo demonstraram que em baixas concentrações as nanopartículas micogênicas não induzem toxicidade ao meio ambiente (RIBEIRO et al., 2022). As AgNP-AT, com tamanho de 35 ± 10 nm, e até 1 mM não foram tóxicas para larvas de *Galleria mellonella* (OTTONI et al., 2019), e a 0,001 mM apresentaram baixa interferência no processo de respiração celular na microbiota do solo (OTTONI et al., 2020). Em sementes de arroz, as AgNPs-AT na alta concentração de 10 μM modularam a partição da biomassa, resultando em diminuição do conteúdo relativo de água nas folhas, aumento do dano à membrana e do conteúdo de carotenoides, além de promoverem clorose. A 500 μM , observou-se completa inibição do crescimento e desenvolvimento das sementes.

Em um estudo paralelo, as AgNP-AT até 10 μM induziram um leve aumento no comprimento da raiz, mas não interferiram no crescimento do caule de sementes de sorgo *Sorghum bicolor*. A exposição de folhas de sorgo a 500 e 1000 μM (53,95 e 107,9 $\mu\text{g/mL}$) das AgNP-AT não promoveu alterações significantes nos indicadores de estresse. Houve um aumento no conteúdo de peróxido de hidrogênio e aumento da atividade das enzimas catalase, ascorbato peroxidase e super óxido dismutase. A porcentagem de perda de eletrólitos que é um indicador fisiológico de dano na membrana da planta não foi alterada para planta exposta até 500 μM (53,95 $\mu\text{g/mL}$) de AgNP-AT. Nas plântulas, o conteúdo relativo de água teve um leve aumento, sendo inferior a 91% para 500 e 1.000 μM de AgNP-AT, enquanto para o grupo controle sem tratamento foi de 87,8% (ZIOTTI et al., 2021).

Em zebrafish (*Danio rerio*), a exposição às AgNP-AT a 200 μM por 24 h não resultou em mortalidade dos animais (OTTONI et al., 2020). Adicionalmente, as AgNP-AT foram 10 vezes menos tóxicas para o camarão *Palaemon pandaliformis* em comparação com AgNO_3 . As AgNP-AT apresentaram concentração letal (CL50) de 17,4; 14,4; 12,6 e 0,5 μM , e o AgNO_3 de 2,5; 1,0; 0,02 e 0,01 μM , nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h, respectivamente. Os valores de CL50 para as nanopartículas foram superiores aos encontrados para AgNO_3 evidenciando a relevância da camada proteica na superfície dessas nanopartículas, a qual controla a liberação dos íons de

prata para o meio externo. As análises histológicas mostraram um aumento significativo no tamanho médio das brânquias do camarão indicando hipertrofia. Entretanto as alterações induzidas por AgNP-AT até 10 μ M nas brânquias e tecido do hepatopâncreas são reversíveis (RIBEIRO et al., 2023).

Com base nos resultados promissores obtidos por nosso grupo com as AgNPs biogênicas, o objetivo deste estudo foi investigar a atividade citotóxica das AgNP-AT, AgNP-Asp, AgNP-BO, AgNP-CPP, AgNP-EN, AgNP-ER e AgNP-FP em células MCF-7 (ATCC HTB-22) e MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), que são de adenocarcinomas de mama humana, e em células MIA PaCa-2 (ATCC CRL-1420), que é uma linhagem de câncer pancreático humano, e em fibroblastos humanos normais FN1.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER E TRATAMENTOS DISPONÍVEIS

O câncer é uma doença multifatorial caracterizada pelo crescimento desordenado das células. A capacidade invasiva, desenvolvimento e progressão da doença estão relacionados a alterações em genes envolvidos na regulação do metabolismo celular, como proliferação, diferenciação e vias apoptóticas. As células tumorais são capazes de invadir tecidos e órgãos adjacentes, ou de outras partes do corpo pelo sistema linfático ou sanguíneo, por processo conhecido como metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O câncer pode afetar qualquer parte do corpo e pode ser classificado, como carcinomas, sarcomas, cânceres do sistema hematológico e linfomas. Entretanto em um único tipo celular, é possível identificar vários tipos de câncer (CARBONE, 2020).

Uma das principais características das células tumorais é a propriedade de evitar a detecção e destruição pelo sistema imunológico do organismo, bem como de criar uma rede de vasos sanguíneos para prover nutrientes e oxigênio ao tumor, além de apresentar heterogeneidade, ou seja, diferentes tipos de células com características e comportamentos únicos. Essas peculiaridades tornam o câncer uma doença desafiadora em termos de tratamento e controle (CARBONE, 2020; XIA et al., 2021).

No ciclo celular, as células normais apresentam mecanismos de verificação ou checkpoints das fases da divisão celular e buscam identificar mutações no DNA, e os eventos subsequentes só ocorrem quando os anteriores são realizados com sucesso. Esses pontos de verificação incluem o checkpoint G1, que avalia a disponibilidade de recursos para a replicação do DNA, detecta danos no DNA e verifica a adequação do ambiente para a divisão; no checkpoint G2 são verificadas a integridade do DNA, a replicação correta e as condições para a mitose; e o checkpoint M, que ocorre durante a mitose garante a correta ligação das cromátides irmãs aos microtúbulos do fuso mitótico. A evasão desses checkpoints é uma característica das células cancerígenas que permite o acúmulo de mutações no DNA formando tumores (MURRAY, 1994).

O câncer é um dos principais desafios para a saúde global, e uma das principais causas de morte representando um obstáculo significativo ao aumento da expectativa de vida em todo o mundo. Em muitos países, é a primeira ou a segunda causa de morte prematura antes dos 70 anos. Estudos anteriores, estimam que uma em cada cinco pessoas terá câncer durante sua vida (FERLAY et al., 2021; SUNG et al., 2021).

Atualmente, o câncer é considerado a segunda principal causa de morte por doenças não transmissíveis em todo o mundo. Dados epidemiológicos mostram que em 2020 foram

registrados cerca de 19,3 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo, e 10 milhões de mortes relacionadas à doença (WHO, 2020). Estima-se que até 2040, o número de novos casos possa chegar a 27,5 milhões anualmente, em razão do crescimento e envelhecimento populacional, estilo de vida inadequado, exposição a fatores ambientais, predisposição genética, bem como a melhoria na tecnologia de diagnósticos (MATTIUZZI; LIPPI, 2019; WHO, 2020).

Dentre os diferentes tipos de câncer, os dez principais representam mais de 60% dos novos casos diagnosticados. Globalmente, o câncer de mama feminina é o mais comum, com 2,3 milhões de novos casos, seguido pelo câncer de pulmão com 2,2 milhões, cólon e reto com 1,9 milhão, próstata com 1,4 milhão, e pele não melanoma com 1,2 milhão de novos casos (INCA,2022). Dentre os diferentes tipos de câncer, o de pâncreas caracteriza-se por sintomas iniciais inespecíficos e rápida disseminação metastática, tornando difícil o seu diagnóstico (PARK; CHAWLA; O'REILLY, 2021). Essas características o tornam um dos tipos mais letais, ocupando o sétimo lugar em mortes relacionadas ao câncer (BRAY et al., 2018).

Com alta prevalência, o câncer de mama atingiu cerca de 2,2 milhões de casos em 2020, com maior incidência no sexo feminino (SUNG et al., 2021; WHO, 2021). Neste grupo, o câncer de mama triplo negativo (TNBC) é uma das formas mais agressiva e invasiva, tendendo a ser mais comum em mulheres com menos de 40 anos (STRINGER-REASOR et al., 2021).

No Brasil, a estimativa para o período de 2023 a 2025 é que ocorram 704 mil novos casos de câncer, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma que é o mais comum no Brasil, representando 31,3% do total de casos, seguido pelo câncer de mama feminina, próstata, cólon e reto, pulmão e estômago (INCA,2022).

A situação atípica da pandemia COVID-19, causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, dificultou a realização de exames de rotina, como a mamografia, e impactou negativamente no diagnóstico e tratamento precoce do câncer (DOLGIN, 2021). Esse cenário aumentou a disparidade no acesso ao tratamento e à cura do câncer que apesar da maior incidência em países com alto índice de desenvolvimento humano (IDH), como os localizados na Europa e América do Norte (TOPORCOV; WÜNSCH FILHO, 2018), o índice de mortalidade é significativamente mais elevado em regiões com menores IDH, principalmente em países asiáticos, africanos e latino-americanos (BRAY et al., 2018; LI et al., 2018).

Os tratamentos antitumorais convencionais, como a quimioterapia, radioterapia e imunoterapia, combinados ou não com outros tratamentos são relativamente eficazes, porém, são vários os desafios a serem superados como, o longo tempo de exposição, altas doses de quimioterápicos, resistência, efeitos adversos e alto custo financeiro para os pacientes e ao Sistema de Saúde (WARGO et al., 2015; EL-READI; ALTHUBITI, 2019; ZHU et al., 2023).

Além disso, a identificação do tamanho do tumor, grau de diferenciação e metástases linfonodais são biomarcadores prognósticos insuficientes para indicar o tratamento mais eficaz (DUFFY; MCDERMOTT; CROWN, 2017). Em vista disso, há uma grande demanda global por tratamentos personalizados para pacientes com câncer.

As células tumorais podem utilizar diversos mecanismos de escape de acordo com o tipo de tratamento utilizado, como a super expressão de bombas de efluxo de drogas, o aumento do metabolismo de drogas, modificação nos alvos moleculares e na expressão de moléculas inibidoras (GENG; PRADHAN; LI, 2022; JIN; WANG; BERNARDS, 2022). As células tumorais também podem modificar o microambiente ao seu redor, criando barreiras físicas, condições hipóxicas e secreção de fatores de crescimento que estimulam a angiogênese (XIAO; YU, 2021). No caso de radioterapia, as células podem ativar vias de reparo de danos no DNA, aumentar a expressão de proteínas anti-apoptóticas e induzir autofagia para sobreviver a espécie reativa de oxigênio (ROS) causado pela radiação (YU et al., 2023).

Existem diversos tratamentos para o câncer, que variam de acordo com o tipo e estágio da doença. A quimioterapia e a radioterapia são convencionalmente utilizadas e consistem, respectivamente, na utilização de medicamentos ou uso de radiação de alta energia para induzir a morte de células tumorais. Essas modalidades de tratamentos possuem alto custo e efeitos adversos graves pela alta toxicidade para células normais, e existe a possibilidade de recidiva ou surgimento de resistência das células tumorais (FAN et al., 2020).

Os medicamentos comumente utilizados para quimioterapia atuam por diferentes mecanismos, impedindo o crescimento e a divisão das células tumorais. Dentre as opções estão a cisplatina, carboplatina, paclitaxel, docetaxel, vincristina, doxorrubicina e fluorouracil (LI et al., 2007).

Cirurgias e transplantes são outras opções de tratamentos comumente utilizados no combate ao câncer, com o inconveniente de serem procedimentos invasivos apresentando riscos (BEST; MUGHAL; GURUSAMY, 2016).

A terapia hormonal é uma alternativa para o tratamento de cânceres com receptores hormonais, pela qual são utilizados medicamentos para bloquear ou reduzir a produção de hormônios que estimulam o crescimento das células tumorais. No entanto, esses medicamentos podem gerar graves efeitos adversos (BURSTEIN et al., 2019). Por outro lado, a terapia fotodinâmica é um método utilizado no tratamento de câncer que se baseia no uso de corantes como a porfirina, a clorina e a ftalocianina, luz de comprimento de onda específico e oxigênio para gerar ROS e, conseqüentemente, induzir a morte celular. Os principais desafios dessa técnica são a falta de especificidade dos fotossensibilizadores e a insolubilidade (DOUGHERTY et al., 1998; SPRING et al., 2015).

A imunoterapia, terapia gênica e a terapia celular são abordagens promissoras para o tratamento do câncer. Pela imunoterapia são administrados medicamentos como pembrolizumabe, nivolumabe e ipilimumabe, que estimulam o sistema de defesa do organismo a reconhecer e destruir células tumorais. Esses medicamentos bloqueiam as proteínas que impedem a resposta imunológica contra o câncer, potencializando a ação das células de defesa do organismo contra as células cancerígenas. Apesar de promissora, a imunoterapia tem alto custo e algumas limitações, como a degradação enzimática e física dos medicamentos, o escape do antígeno e a curta durabilidade da resposta (CHOW et al., 2022).

Pela terapia gênica genes funcionais são introduzidos nas células tumorais, usando vetores seguros e eficientes. Nessa abordagem podem ser inseridos genes que codificam proteínas para indução da morte celular ou bloqueio da expressão de genes envolvidos no crescimento do tumor. Apesar dos desafios para evitar reações adversas e controlar a expressão dos genes, a terapia gênica é promissora e pode ser, no futuro, uma opção viável (LEEBEEK; MIESBACH, 2021; STERNER; STERNER, 2021).

Na terapia celular, células modificadas são inseridas no organismo, essas células podem ser obtidas do próprio paciente (terapia autóloga) ou de um doador (terapia alogênica). Diferentes tipos de terapia celular são aplicados, como o transplante de células-tronco hematopoéticas para doenças sanguíneas e do sistema imunológico, o uso de células-tronco mesenquimais para condições inflamatórias e autoimunes, e o emprego de células dendríticas para estimular a resposta imunológica contra o câncer (LATTIME; GERSON, 2013). No entanto, esse tratamento é caro, as células demoram para serem geradas e requer atenção médica especializada devido à forte reação inflamatória no corpo (BERRIEN-ELLIOTT; JACOBS; FEHNIGER, 2023).

A terapia-alvo é uma abordagem que tem como alvo moléculas específicas envolvidas no crescimento e sobrevivência das células tumorais, minimizando os efeitos adversos. Os medicamentos principais incluem imatinibe, trastuzumabe, erlotinibe, bevacizumabe, cetuximabe e rituximabe, que são indicados para diferentes tipos de câncer. Embora seja uma abordagem cada vez mais comum e eficaz, além do alto custo pode ocorrer efeitos indesejados, e adaptação das células cancerígenas com possibilidade de sobrevivência (LAU et al., 2022). Atualmente, nanopartículas à base de polímeros, micelas, lipídeos, dendrímeros, apoferritinas, e principalmente, alguns tipos de metais têm sido investigados como alternativas para esta terapia (KHALIL et al., 2022).

Estudos recentes têm mostrado que nanopartículas podem melhorar a biodisponibilidade e a eficácia dos medicamentos, reduzindo a toxicidade sistêmica associada à quimioterapia convencional. Especificamente, as nanopartículas magnéticas têm sido

investigadas pela capacidade de interação com as células tumorais, facilitando o diagnóstico e/ou o tratamento, o que as torna uma opção para teranóstica (KHALIL et al., 2022).

2.1.1 CÂNCER TNBC E ESTRATÉGIAS PARA O TRATAMENTO

Como descrito, existem vários desafios para os tratamentos antitumorais disponíveis, principalmente porque o câncer é uma doença multifacetada que apresenta características variáveis dependendo do tipo de célula que originou o tumor, do estágio da doença, do tamanho e localização do tumor, da presença ou não de metástases para demais tecidos.

O câncer de mama TNBC é considerado um dos subtipos mais agressivos e com prognóstico mais desfavorável, sendo comum em mulheres jovens e em afrodescendentes, que em geral são menos sensíveis ao tratamento que se torna menos efetivo nesses casos (STRINGER-REASOR et al., 2021; LEHMANN et al., 2011; TAPAK et al., 2023).

Alguns estudos sugerem que o TNBC pode ser dividido em pelo menos seis subtipos: *basal-like 1*, *basal-like 2*, mesenquimal, imunomodulatório, mesenquimal com células tumorais do tipo *stem* e luminal *androgen receptor*. Cada subtipo pode ter diferentes respostas aos tratamentos, risco de recorrências, necessidade de tratamentos personalizadas com impacto na qualidade de vida dos pacientes (MANJUNATH; CHOUDHARY, 2021). Consequentemente, as opções de tratamento são ainda mais limitadas e geralmente envolvem quimioterapia e radioterapia. Este cenário, evidencia a demanda por novos tratamentos.

O câncer de mama TNBC não apresenta os receptores hormonais (estrogênio, progesterona) e receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2)) que são alvos comuns de terapias específicas como as hormonais e as terapias-alvo. No entanto, o TNBC pode conter receptores específicos como o receptor de andrógeno, tirosina quinases, fosfatases, proteases e a via de sinalização PI3K/Akt. Os miRNAs e os lncRNAs são outros potenciais alvos terapêuticos para o TNBC. As estratégias terapêuticas relacionadas aos miRNAs podem abranger o uso de oligonucleotídeos antisense para a inibição de oncomiRNAs, a restauração de supressores tumorais por meio de mimetizadores de miRNAs e até mesmo a modificação química dos miRNAs. Por outro lado, os lncRNAs, como HOTAIR, SPRY4-IT1, GAS5 e PANDAR, emergem como atores recentemente identificados no desenvolvimento e prognóstico de tumores mamários, e também têm potencial aplicação terapêutica no tratamento do câncer de mama (NAGINI, 2017).

Em um estudo publicado em 2019, foi analisado o papel das terapias direcionadas a alvos moleculares específicos no tratamento do câncer TNBC. Os resultados indicaram que, até o momento, essas terapias têm apresentado resultados limitados em melhorar clinicamente os desfechos dos pacientes com TNBC. Em outras palavras, os benefícios clínicos observados

foram geralmente modestos, com poucas melhorias significativas (GARRIDO-CASTRO; LIN; POLYAK, 2019). Dessa forma, a quimioterapia continua sendo considerada o tratamento padrão e mais eficaz para o TNBC, porém pode ter efeitos adversos significativos. A quimioterapia pode ser administrada antes da cirurgia para reduzir o tamanho do tumor e melhorar as chances de sucesso da cirurgia, ou após a cirurgia para eliminar as células cancerígenas remanescentes e prevenir a recorrência. Devido a comprovada efetividade em pacientes com TNBC 2, essa abordagem tem sido mais adotada (BURSTEIN et al., 2019).

2.2 NANOPARTÍCULAS DE PRATA E AÇÃO ANTITUMORAL

Com o avanço da Nanobiotecnologia, surgem novas abordagens diagnósticas e terapêuticas para o câncer. Neste contexto, as nanopartículas destacam-se pelo amplo potencial de aplicações na medicina, para tratamento de infecções bacterianas, fúngicas, virais e potencial antitumoral (JAIN, 2011).

As NPMs, geralmente têm diâmetro entre 1 e 100 nanômetros (nm) e são formadas por um sistema coloidal com grande área superficial em relação ao seu tamanho. Essa característica confere a essas nanopartículas propriedades físicas e químicas únicas, como alta reatividade e capacidade de interagir com biomoléculas. As NPMs têm como vantagem a possibilidade de aplicação em sistemas biológicos por apresentarem baixa toxicidade e imunogenicidade. Dentre as NPMs, as AgNPs são mais estudadas para aplicações em medicina, como em diagnóstico e terapêutica (AGHEBATI-MALEKI et al., 2020; HUSAIN et al., 2023).

As AgNPs são utilizadas em diversas aplicações ao longo da história, mas a primeira aplicação documentada remonta ao antigo Império Romano, onde a prata coloidal era usada como agente antimicrobiano. A utilização moderna de AgNPs teve início na década de 1990, quando suas propriedades físico-químicas começaram a ser exploradas na medicina, eletrônica, área têxtil e outros setores. Desde então, as AgNPs têm sido amplamente utilizadas como antimicrobianos, catalisadores, sensores, dispositivos eletrônicos, entre outros (RAI; YADAV; GADE, 2009).

Estima-se que a produção mundial de AgNPs seja de 5,5 a 550 toneladas por ano e que esse número aumentará para aproximadamente 800 toneladas até 2025 (MANSOOR et al., 2021). É possível que as AgNPs estejam presentes em pelo menos 30% dos 800 produtos comerciais que contém nanopartículas (PICCINNO et al., 2012; CERIMI et al., 2019).

As NPMs são geralmente carregadas positivamente pela presença de grupos orgânicos, e adicionalmente, as suas propriedades físico-químicas permitem processos de engenharia de materiais para manipulação e alteração da funcionalidade e/ou especificidade da ação desejada (FALLEIROS; BRANDL; FONSECA, 2011). Estudos têm mostrado, que nanopartículas com

cargas positivas são mais adequadas para aplicações biológicas, pois possuem maior tempo de permanência na corrente sanguínea (TABATA; IKADA, 1988), a qual, é a principal via de administração de agentes antitumorais (SCHLINKERT et al., 2015). Entretanto, a presença de carga superficial negativa auxilia na repulsão entre as partículas impedindo a agregação, e a dispersividade é uma característica importante para penetração das nanopartículas nas células tumorais (LEITE et al., 2012).

As AgNPs apresentam diversas propriedades que incluem ação biocida, excelente para uso médico; alta condutividade elétrica, útil em aplicações eletrônicas; estabilidade térmica, viável em aplicações de alta temperatura; propriedades ópticas exclusivas; facilidade de síntese, tornando-as uma escolha interessante para aplicações comerciais; boa biocompatibilidade e baixa toxicidade em concentrações terapêuticas, o que as torna viáveis para uso médico (DE SOUZA 2023). Essas características têm aumentado o interesse pelo uso de AgNPs no tratamento do câncer, incluindo o câncer de mama TNBC, para o qual ainda não existem medicamentos específicos aprovados pela FDA (MATYSIAK-KUCHAREK et al., 2020).

A ressonância plasmônica de superfície, propriedade óptica das NPMs, contribui para o diagnóstico por imagens permitindo a detecção e visualização de tumores por meio de técnicas como tomografia computadorizada, ressonância magnética e imagem por fluorescência (BELLASSAI et al., 2019).

Considerando a falta de receptores específicos em células do câncer TNBC, a utilização de AgNPs pode ser efetiva para o tratamento. Características das AgNPs em termos de tamanho, forma e revestimento podem ser ajustadas para torná-las mais seletivas para a célula tumoral. AgNPs possuem propriedades imunomoduladoras e induzem a formação de ROS, interação com o DNA e inibição da proliferação celular. Com essas propriedades, as AgNPs representam uma opção interessante para investigação da ação antitumoral (FÉLIX-PIÑA et al., 2023).

É importante ressaltar que as AgNPs podem ser produzidas por método ecologicamente sustentável (ecofriendly), por biorredução do metal precursor (prata, ouro). As nanopartículas biológicas podem ser obtidas utilizando plantas, algas, bactérias, leveduras ou fungos (BALLOTTIN et al., 2016; RAI et al., 2021) e podem ter revestimento proteico que confere alta estabilidade e diversas possibilidades de aplicação (RAI et al., 2021; SANTHOSHKUMAR et al., 2023). Normalmente, os agentes redutores ou estabilizantes são enzimas como a nitrato redutase e/ou moléculas com grupos funcionais de éter, tiol, carbonila, hidroxila, amina, poliamina, proteínas ou peptídeos, que podem formar um revestimento na superfície das nanopartículas (KATHIRESAN et al., 2009; SUBRAMANIAN; ALIKUNHI; KANDASAMY, 2010; BEELER; SINGH, 2016).

O revestimento proteico presente nas AgNPs biogênicas proporciona vantagens no tratamento de doenças devido à melhor biocompatibilidade, internalização celular, controle da liberação de íons Ag^+ e redução de possíveis efeitos adversos (DE SOUZA, 2023). Quando internalizados, os íons de prata se localizam no citoplasma e afetam o potencial e a função da membrana mitocondrial, levando à apoptose (MARTÍNEZ-GUTIERREZ et al., 2012). Além disso, pode ocorrer alterações no fenótipo da célula tumoral, destruição das estruturas e topografia do citoesqueleto, alteração da membrana e rigidez celular (XIAO; CHEN; ALNAGGAR, 2019).

Nanopartículas de óxido de ferro, AgNPs e de ouro (AuNP) têm sido muito estudadas em decorrência da interessante atividade antimicrobiana, antibiofilme e antitumoral. Essas nanopartículas são promissoras para aplicação oncológica favorecida pelas propriedades magnéticas, tamanho reduzido, biocompatibilidade e possibilidade de direcionamento específico para células-alvo, principalmente pela funcionalização da superfície com ligantes para prolongar o tempo de ação e melhorar o tratamento (RODRIGUES et al., 2013; ORTEGA et al., 2015; BALLOTTIN et al., 2016; OTTONI et al., 2018; RAI et al., 2021; SANFELICE et al., 2021; RIBEIRO et al., 2023).

Os tecidos tumorais têm alta permeabilidade vascular e drenagem linfática deficiente, permitindo a fácil difusão de nanopartículas para as células, causando a morte. As NPMs com tamanhos reduzidos tendem a se acumular mais neste tecido do que nos tecidos normais, pelo fenômeno passivo de aumento da permeabilidade e retenção (APR), geralmente resultando em diminuição na taxa de progressão do tumor. A presença de moléculas hidrofílicas na superfície das NPMs pode aumentar a biodisponibilidade e meia-vida, protegendo-as da fagocitose por macrófagos e degradação (GIL; PARAK, 2008).

Sob radiação eletromagnética, AgNPs e de AuNPs, são capazes de produzir calor com temperatura acima de 50 °C em tecidos tumorais, causando ruptura tumoral por necrose atribuída à absorção e conversão de energia de ondas próximo ao infravermelho (fotoablação) (BARZAMAN et al., 2020).

O mecanismo de ação antitumoral das AgNPs, incluindo o câncer TNBC, ainda não é completamente descrito, mas existem algumas hipóteses. As AgNPs podem induzir apoptose nas células tumorais, por inibição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e ativação da proteína pró-apoptótica Bax, levando à ativação de caspases e à morte celular (SRIRAM et al., 2010). AgNPs também geram ROS (SONKER et al., 2017), que possuem alta reatividade e podem causar danos no DNA e consequente morte celular. Outro mecanismo proposto, é a inibição da proliferação celular pela ação das nanopartículas nas fases do ciclo celular, ou ainda pela inibição de importantes vias de sinalização que são cruciais para a sobrevivência celular.

Consequentemente, essas ações poderiam impedir o crescimento e a disseminação do câncer (BUTTACAVOLI et al., 2017; RODRÍGUEZ-RAZÓN et al., 2018). As AgNPs podem também atuar no sistema imunológico, estimulando a produção de citocinas e a atividade de células imunes, com redução da angiogênese local, que é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir dos pré-existentes e que é fundamental para o crescimento dos tumores (KITIMU et al., 2022).

Apesar dos avanços, as pesquisas com uso de AgNPs para o tratamento do câncer, incluindo o câncer de mama TNBC, ainda estão em estágio inicial e há muitos desafios a serem enfrentados. A compreensão dos mecanismos de ação das NPMs, assim como a otimização da biodisponibilidade, segurança e eficácia, são fundamentais para a futura aplicação clínica desse nanomaterial.

2.3 APLICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS NA BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades microbiana do planeta (DUARTE et al., 2013), e pesquisas que promovam o conhecimento desses organismos, e suas potenciais aplicações têm grande importância econômica e social para o país.

A capacidade de adaptação aos fatores ambientais extremos decorre da regulação da expressão de genes específicos no genoma dos micro-organismos (DHAKAR; PANDEY, 2016; ZHANG et al., 2018). As estratégias de sobrevivência são extraordinárias e responsáveis pela produção de enzimas e outros metabólitos com aplicações biotecnológicas, como na área ambiental (biorremediação, biodegradação e biocontrole), industrial (biomineração, biodiesel e alimentícia) e/ou médica (antibióticos, antifúngicos e antitumorais) (DHAKAR; PANDEY, 2016; ZHANG et al., 2018).

A nanotecnologia tem grande importância no desenvolvimento de tecnologias e produtos, principalmente quando desenvolvida de forma sustentável (SUBBAIYA et al., 2017; BARABADI; KOBARFARD; VAHIDI, 2018).

Os grupos funcionais presentes na camada externa de nanopartículas biogênicas permitem o uso tanto na área medicinal como na agricultura, auxiliando na biocompatibilidade e na diminuição dos efeitos adversos (DE SOUZA; RODRIGUES, 2015; ZHANG et al., 2016; BARABADI et al., 2019). Esses grupos funcionais podem também ser adicionados às NPMs durante o processo de síntese química, mas essa etapa adicional gera mais gastos e resíduos (ZHANG et al., 2016).

A preparação das nanopartículas por métodos químicos e físicos têm como desvantagens o alto consumo de energia e geração de resíduos tóxicos ao meio ambiente (ZHANG et al.,

2016). Os métodos biológicos são ambientalmente favoráveis por seguirem o princípio da química verde que preza pela redução e/ou eliminação do uso e/ou geração de produtos tóxicos no desenho, fabricação e aplicação de produtos químicos (ANASTAS; WARNER 1998).

Existe grande esforço para a aplicação de micro-organismos na biossíntese de nanopartículas, especialmente as metálicas obtidas de forma extracelular pela reação de metabólitos dos micro-organismos com sal metálico (JUIBARI et al., 2015). A biossíntese intracelular envolve o transporte de íons metálicos para o interior da célula e a interação eletrostática da parede celular (carga negativa) com estes íons (carga positiva) é fundamental para que ocorra a oxirredução e formação das NPMs (HULKOTI; TARANATH, 2014). Ambos os processos permitem a obtenção de NPMs com tamanho e morfologia bastante homogêneos, e revestimento proteico que oferece estabilidade e possibilidade de associação a outros grupos específicos, porém a biossíntese intracelular demanda etapas adicionais para a obtenção das NPMs (DE SOUZA; RODRIGUES, 2015).

A obtenção de NPMs com a utilização de espécies de fungos apresenta diversas vantagens, tais como: (1) facilidade de cultura em larga escala; (2) processamento da biomassa de forma menos complexa que um processo industrial; (3) controle da síntese de nanopartículas com diferentes composições químicas, formas e tamanhos; (4) viabilidade econômica e ambiental; (5) resistência a pressão de fluxo e agitação em biorreatores devido à presença dos micélios; (6) Eficiência na redução de cátions (GADE et al., 2008; NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ação citotóxica de AgNPs biogênicas em células tumorais humanas.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Biossíntese de AgNPs biogênicas utilizando as espécies de fungos *A. tubingensis*, *Aspergillus* spp. *B. ochroleuca*, *C. pini-ponderosae*, *F. proliferatum*, *E. nigrum* e *E. rostratum*, codificadas como AgNP-AT, AgNP-Asp, AgNP-BO, AgNP-CPP, AgNP-FP, AgNP-EN e AgNP-ER.
2. Caracterização físico-química das AgNPs, por espectrofotometria UV-Vis, análise do tamanho por espalhamento de luz (Dynamic Light Scattering - DLS), determinação do potencial Zeta, microscopia eletrônica de transmissão (MET), e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), Avaliação da ação citotóxica das AgNPs por ensaio de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio).
3. Seleção da AgNP mais efetiva (AgNP^{Efetiva}) e da célula tumoral mais sensível (CT^{Alvo})
4. Estudo da ação citotóxica da AgNP^{Efetiva} sobre a CT^{Alvo} por:
 - a. Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo;
 - b. Indução de apoptose/necrose - marcação com anexina / iodeto de propídeo;
 - c. Determinação da proliferação celular (CFSE);
 - d. Ensaio de mutagênese

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESPÉCIES FÚNGICAS E LINHAGENS CELULARES

As cepas de fungos utilizadas para a biossíntese das AgNPs foram previamente isoladas da biodiversidade brasileira seguindo um protocolo estabelecido por Araújo et al. (2001).

As espécies epífitas *C. pini-ponderosae* (IAL 7248), *F. proliferatum* (IOC 4682/IAL 7246) e *E. nigrum* (IAL 7249) e as endofíticas *A. tubingensis* e *Aspergillus* spp. foram isoladas da folha da planta de mangue *Rhizophora mangle*, enquanto a espécie endofítica *E. rostratum* (IAL 7247) foi isolada da planta *Croton blanchetianus*, coletada no bioma Caatinga.

Essas espécies foram anteriormente depositadas na coleção de micro-organismos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), Instituto Adolfo Lutz (IAL, São Paulo, SP, Brasil), ou na “Coleção de Microrganismos para Biocontrole de Fitopatógenos e Plantas Daninhas” da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN, Brasília, DF, Brasil).

As células utilizadas são de adenocarcinomas de mama humana MCF-7 (ATCC HTB-22) e MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), e de câncer pancreático humano MIA PaCa-2 (ATCC CRL-1420) e de fibroblastos humanos normais FN1. Essas células foram selecionadas para o ensaio de citotoxicidade considerando a importância médica e a disponibilidade no Laboratório de Desenvolvimento e Inovação do Instituto Butantan. As células FN1 foram isoladas em 2006 de blefaroplastia realizada na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob aprovação do comitê de ética, regulamentação e autorização do paciente (Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP – CAPpesq project # 921/06), e estabelecidas em cultura pelo Prof. Durvanei A. Maria.

As células de pulmão de hamster chinês V79-4 (0244), utilizadas no ensaio de mutagênese foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ).

4.2 BIOSSÍNTESE DAS AgNPS E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Para a biossíntese das AgNPs, os fungos *Aspergillus* spp., *A. tubingensis*, *B. ochroleuca*, *P. maxima*, *C. pini-ponderosae*, *F. proliferatum*, *E. nigrum*, e *E. rostratum* foram cultivados em meio sólido ágar batata dextrose (BDA) (Himedia #M096) por 96 h a 28 °C, e depois em meio líquido batata dextrose (BD) (Kasvi #K25-610106) por 72 h a 28 °C e 150 rpm (agitador orbital Marconi MA-420, Brasil). A biomassa de cada espécie foi filtrada em membrana de polipropileno e lavada com água deionizada estéril para remoção dos resíduos de meio de cultura. A biomassa foi incubada com água deionizada estéril a 28 °C e 150 rpm por 72 h (10 g/100 mL), e na sequência removida por filtração em membrana de polipropileno. O

sobrenadante aquoso foi novamente filtrado em membrana de polietersulfona de 0,22 μm (Corning #43111) para a remoção de fragmentos celulares e esterilização. Ao extrato aquoso (EA) estéril obtido da cultura de cada espécie de fungo, foi adicionado nitrato de prata (AgNO_3) para a concentração final de 1 mM (1 mL AgNO_3 a 100 mM para cada 99 mL filtrado). A mistura reacional foi mantida protegida da luz e o monitoramento da formação das AgNPs foi realizado por leitura da absorvância em espectrofotômetro (Agilent 8453) e presença de ressonância plasmônica em torno de 420 nm.

Os Anexos A e B ilustram o processo de biossíntese das AgNPs anteriormente descrito (RIBEIRO et al., 2023), que foram caracterizadas pela determinação do tamanho, índice de polidispersidade (PDI) e potencial Zeta que mede a carga elétrica na superfície por DLS (Nanoplus – Particulate Systems), morfologia por MET (Zeiss LEO 906 E, de 120Kv) e FTIR (Jasco, FT/IR-4700) (RODRIGUES et al., 2019; RIBEIRO et al., 2023).

A análise por MET foi realizada utilizando amostras depositadas em um porta amostra de cobre recoberto com filme de parlódio. Por essa análise, foi possível observar a forma e distribuição das AgNPs. A análise por DLS foi realizada em duplicata por dispersão das AgNPs em solução de KCl a 1 mM 1:1 (v/v).

A concentração das AgNPs usadas nos ensaios, em molaridade, foi fundamentada na concentração de Ag^0 presente nas AgNPs e quantificada por nosso grupo por Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES) e comparação a uma curva padrão da prata (RODRIGUES et al., 2019). Os cálculos anteriores mostraram que a reação com AgNO_3 é efetiva e próxima a 100%, portanto, as AgNPs formadas são consideradas com concentração em torno de 1 mM de Ag^0 .

4.3 AVALIAÇÃO DA AÇÃO CITOTÓXICA DAS AGNPS POR ENSAIO DE MTT

As células MDA-MB-231, MCF-7, MIA PaCa-2 e FN1 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Vitrocell #R0080) (pH=7,4) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell #S0011) e antibióticos (50 UI/mL de penicilina e 50 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina) (Vitrocell #P0403) em incubadora úmida a 37 $^\circ\text{C}$ e 5% CO_2 , até confluência de aproximadamente 80%. Para realizar os ensaios, as células foram coletadas por tripsinização (tripsina/EDTA, Vitrocell #T2500), processadas, contadas em câmara de Neubauer, e distribuídas na proporção de 100 $\mu\text{L/poço}$ (1×10^5 células/mL) em placas de 96 poços (Corning #3595). As placas foram incubadas a 37 $^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ overnight (± 12 h) para realização do ensaio de redução do sal 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983).

Esse ensaio se baseia na reação de oxidação redução do MTT formando o produto formazan, por ação da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (MOSMANN, 1983). Após a incubação, o meio de cultura foi removido dos poços e as células foram tratadas com 100 μ L das AgNPs diluídas em meio RPMI com antibióticos e livre de SFB na concentração de 0,015, 0,03, 0,06, 0,125 e 0,25 mM por 24, 48 e 72 h, e em sextuplicata. Após a incubação, o meio de cultura com os tratamentos foi substituído por uma solução de MTT a 0,5 mg/mL em meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol e sem SFB. Como controles as células foram tratadas com o antitumoral cisplatina (dicloreto de cis-diaminaplatina (II)), (Sigma #P4394) de 0,03 a 0,25 mM ou mantidas somente com meio de cultura RPMI 1640 (pH=7,4) suplementado com SFB e antibióticos, consideradas como 100% de viabilidade celular. O ensaio foi repetido por três vezes.

A citotoxicidade foi expressa pelo valor igual ou superior ao IC50 ou CC50 (concentração que inibe o crescimento celular em 50%) para células tumorais e para os fibroblastos normais, respectivamente. Os valores de IC50 e CC50 foram determinados pela curva de regressão não-linear elaborada utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.1. Os valores de IC50 e CC50 foram utilizados para cálculo do índice de seletividade (IS) das AgNPs ($IS=CC50/IC50$). Nessa etapa foram selecionadas a $AgNP^{Efectiva}$ e a CT^{alvo} para continuidade do estudo.

4.4 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para essa análise, as células MDA-MB-231 e FN1 foram distribuídas em placas de 12 poços (2×10^5 células/poço) e tratadas com AgNP-AT por 24, 48 e 72 h na concentração de 0,015; 0,03 (IC50) e 0,06 mM. O grupo controle negativo foi tratado com meio de cultura contendo antibióticos, e o controle positivo com cisplatina a 0,03; 0,07 (IC50) e 0,152 mM. As concentrações utilizadas para as AgNP-AT e cisplatina representam o valor de IC50, e uma concentração abaixo e outra acima do valor de IC50 selecionadas para continuidade do estudo da ação citotóxica das AgNP-AT. O ensaio foi realizado em sextuplicata e repetido duas vezes.

Após o tratamento, as células foram coletadas e centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. Em seguida, as células foram suspensas em 1 mL de etanol 70% e armazenadas a -20 °C por 24 h. Após o descongelamento e centrifugação, as amostras foram suspensas em 1 mL de tampão fosfato de sódio (PBS) e novamente centrifugadas. As células foram suspensas com 200 μ L de tampão PBS contendo RNase (100 μ g/mL), iodeto de propídio (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich #P4170) e Triton-X a 0,1%. As células foram mantidas incubadas por 30 min a 25 °C na ausência de luz. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 min, suspensas em 200 μ L de tampão FACS, transferidas para tubos de citometria e analisadas em

citômetro de fluxo FACS Calibur (Fluorescence Activated Cell Analyzer - Becton Dickinson, EUA) na intensidade de fluorescência FL-2 (10.000 eventos). Os histogramas foram analisados usando o software ModFit LT™3.2 (BD), e os dados, incluindo a análise estatística com o software GraphPad Prism versão 6.0.

4.5 DETERMINAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A análise de proliferação celular permite avaliar a ação de determinada substância sobre o crescimento celular por algumas gerações (CHUNG et al., 2017). Para a realização do ensaio, uma suspensão com as células MDA-MB-231 e FN1 foi preparada a 5×10^6 células/mL. As células foram marcadas com CFSE (Carboxi-fluoresceína diacetato succinimidil ester) (Molecular Probes #C34554) a 5 mM e incubadas por 20 min a 25 °C, sob leve agitação e proteção da luz. Em seguida, o meio RPMI contendo 1% de SFB foi adicionado e as células foram centrifugadas a 1500 rpm a 20 °C, por 5 min. Após centrifugação, as células foram suspensas em meio RPMI completo (1×10^5 células/mL), distribuídas em placas de 12 poços, e incubadas por ± 12 h a 37 °C/5% CO₂. Posteriormente, as células foram tratadas por 24 h com AgNP-AT a 0,015; 0,03 (IC50) e 0,06 mM. O ensaio foi realizado em sextuplicata e repetido duas vezes.

O grupo controle negativo foi tratado com meio de cultura contendo antibióticos, e o controle positivo com cisplatina a 0,03; 0,07 (IC50) e 0,152 mM. Após a incubação as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1200 rpm por 5 min. As células foram suspensas em 200 µL de tampão FACS e transferidas para tubos de citometria. A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (Fluorescence Activated Cell Analyzer - Becton Dickinson, EUA). Os histogramas foram analisados usando o software ModFit LT™3.2 (BD), e os dados, incluindo a análise estatística com o software GraphPad Prism versão 6.0.

4.6 INDUÇÃO DE APOPTOSE/NECROSE - MARCAÇÃO COM ANEXINA V / IODETO DE PROPÍDEO

Para a realização do ensaio, células MDA-MB-231 e FN1 foram distribuídas em placas de 6 poços (4×10^5 células/poço) e tratadas por 24 h com AgNP-AT a 0,015; 0,03 (IC50) e 0,06 mM. O grupo controle negativo foi tratado com meio de cultura contendo antibióticos e o controle positivo com cisplatina a 0,03; 0,07 (IC50) e 0,152 mM. O ensaio foi realizado em sextuplicata.

Após o tratamento, as células foram coletadas e centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. Em seguida, as células foram suspensas em 1 mL de PBS para nova “lavagem” e centrifugação. As células foram ressuspensas em tampão de ligação (1×10^5 células/poço) e transferidas para um tubo de 5 mL, onde foram adicionados 5 µL de FITC Anexina V (BD # 556420) e 5 µL de iodeto de propídio (PI) (BD #556463). As células foram agitadas suavemente e mantidas por 15 min. a 25°C, na ausência de luz. Após a incubação, 400 µL de tampão de ligação foram adicionados às amostras que foram imediatamente analisadas por citometria de fluxo FACS

Calibur (Fluorescence Activated Cell Analyzer - Becton Dickinson, EUA). Gráficos e análises estatísticas foram realizados usando o software GraphPad Prisma versão 6.0.

4.7 ENSAIO DE MUTAGÊNESE CROMOSSÔMICA

As células V79-4 (0244) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com SFB (10%) e antibióticos em incubadora a 37 °C/5% de CO₂. As células foram plaqueadas sobre lamínulas em uma placa de 12 poços (1x10⁵ células/poço) e incubadas a 37 °C/5% CO₂ por 24 h. Em seguida, o meio de cultura foi removido e as células foram “lavadas” com PBS (pH 7,4), e tratadas com 0,125 a 2 µM de metil metanossulfonato (MMS) (Sigma #129925) por 24 h e fixadas com solução de Carnoy (ácido acético:etanol 1:3). Após 24 h, as células foram coradas com solução de Giemsa 5% por 5 min. O MMS foi utilizado como composto de referência para padronizar a concentração capaz de induzir alteração cromossômica nas células.

As células V79-4 foram tratadas com as AgNP-AT a 0,03 mM por 4,5 h, e em seguida, foram expostas a Colcemid® (N-desacetil-N-metilcolchicina) (Sigma #360406) a 0,1 µg/mL por 1,5 h. A exposição ao Colcemid® é para inibir a formação do fuso acromático pela dissolução da tubulina e para interromper o ciclo celular na metáfase, com os cromossomos se espalhando sobre o núcleo e a contração gradual do cromossomo.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Zeiss Axio Imager.M2 e as imagens capturadas usando o software Zeiss Zen lite. Para cada tratamento, pelo menos, 300 células foram analisadas quanto a integridade e quantidade dos centrômeros em cada cromossomo. Quebra e trocas de cromátides são consideradas como aberrações cromossômicas.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatísticas, os dados foram expressos em média ± erro padrão. A análise dos dados do ensaio de citotoxicidade e apoptose/necrose foi realizada utilizando o teste ANOVA com Dunnett para comparações múltiplas com o grupo controle sem tratamento. Para análise dos dados de ciclo celular e proliferação celular foi utilizado o teste ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas Turkey.

5 RESULTADOS

5.1 BIOCÍNTese DAS AgNPS E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

O tamanho das AgNPs foi avaliado por DLS e por MET. Por MET os tamanhos foram de $33,3 \pm 2,7$; $25,0 \pm 6,5$; $21,8 \pm 4,1$; $35,8 \pm 5,16$; $28,0 \pm 6,31$; $22,1 \pm 2,9$ e $26,7 \pm 5,3$ nm para AgNP-Asp, AgNP-AT, AgNP- BO, AgNP-CPP, AgNP-EN, AgNP-ER e AgNP-FP, respectivamente (Anexo C). Entretanto pela técnica de DLS, a qual mede o tamanho hidrodinâmico das AgNPs considerando também a corona proteica ao redor do íon metálico, foram detectados tamanhos maiores que os observados por MET para todas as AgNPs, sendo de 44,9, 43,4, 120,6, 87,1, 71,2, 86,4, 59,6, para AgNP-Asp, AgNP-AT, AgNP- BO, AgNP-CPP, AgNP-EN, AgNP-ER e AgNP-FP, respectivamente (Anexo C). Por MET foi observado que as AgNPs têm formas predominantemente esféricas (Anexo D).

A análise por FTIR indicou a presença de anéis aromáticos, grupos funcionais de éter, carboxílicos e amida na composição das AgNPs (RIBEIRO et al., 2023) (Anexo E, F). Todas as AgNPs biossintetizadas apresentaram banda na região 3200 cm^{-1} referente ao grupo OH (quelato) evidenciando a quelação do íon metálico (Ag^+), sem modificação da estrutura secundária das proteínas (RIBEIRO et al., 2023) (Anexo G). As bandas observadas indicaram a presença de diferentes grupos funcionais ao redor da superfície das nanopartículas (Anexo G), conforme relatado anteriormente por nosso grupo (RODRIGUES et al., 2013; BALLOTTIN et al., 2016; RIBEIRO et al., 2023). Outros grupos funcionais foram detectados e atribuídos a resíduos de aminoácidos presentes nas cadeias laterais das proteínas de revestimento (RIBEIRO et al., 2023). A constatação de um revestimento proteico é de suma importância, uma vez que essa característica pode conferir melhor interação das AgNPs com a célula-alvo (JACKSON; PATANI; ISRAEL, 2017).

5.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS AGNPS POR ENSAIO DE MTT

Os resultados da citotoxicidade estão apresentados nas figuras 1 e 2 e na Tabela 1. Pode-se observar que as AgNP-AT foram citotóxicas para as células MIA PaCa-2 e MCF-7, em 24 h, inibindo a proliferação celular de maneira dose dependente em todas as concentrações testadas. A 0,015; 0,03 e 0,06 mM, a AgNP-AT inibiu o crescimento celular de MIA PaCa-2 e MCF-7 em 90%, e o valor do IS foi de 3,30. Em células MDA-MB-231 o IS foi de 1,31.

Em 24 h, a AgNP-BO apresentou IS de 3,73; 1,48 e 1,81, para as células MIA PaCa-2, MDA-MB-231 e MCF-7, respectivamente. Para MIA PaCa-2, a AgNP-BO a 0,03 mM inibiu 92% do crescimento celular, e para 0,06 mM, em MCF-7 e MDA-MB-231 a inibição foi de 84% e 90%, respectivamente.

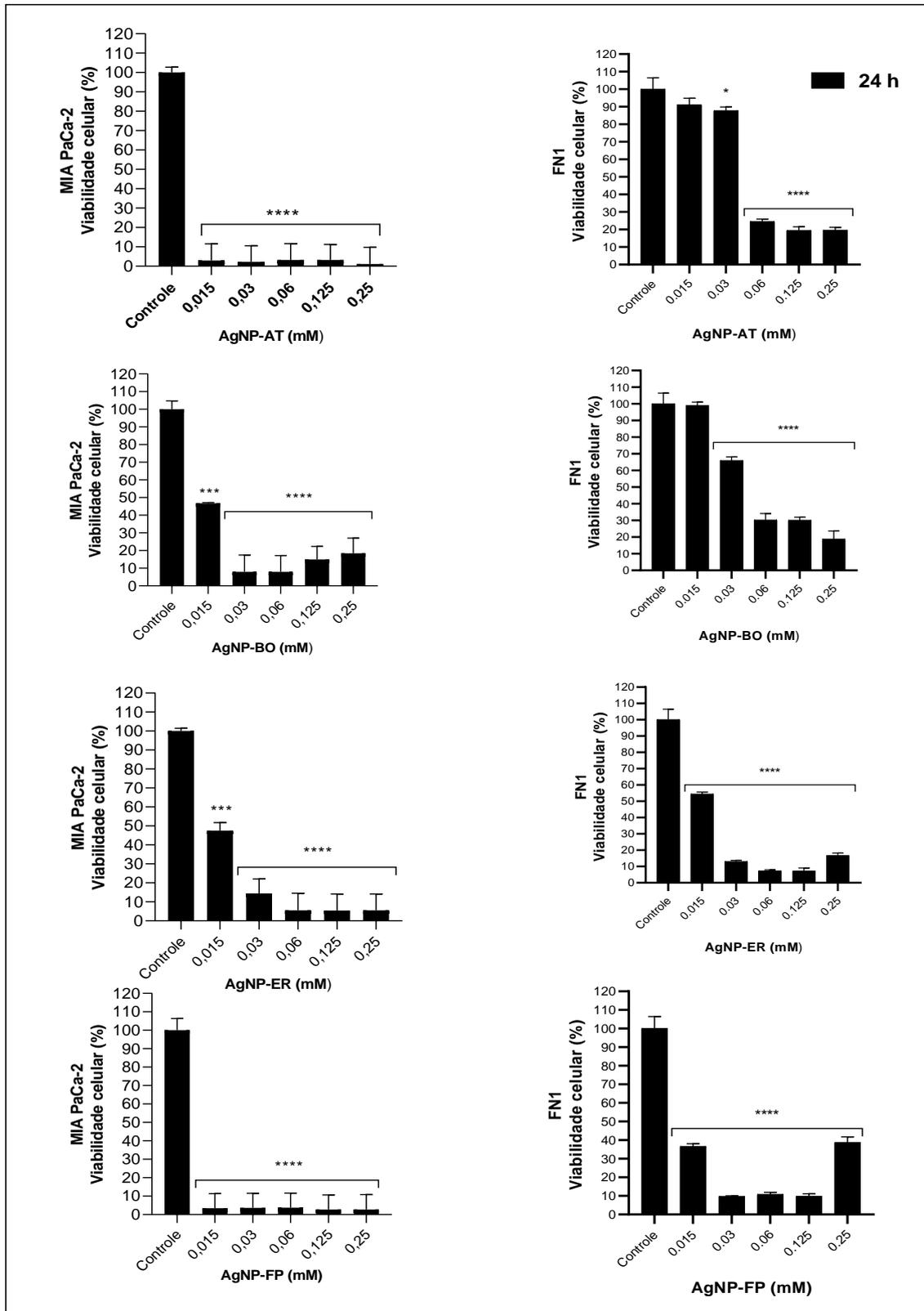
Para as AgNP-FP o IS foi 0,33; 1 e 1,56, nas células MDA-MB-231, MIA PaCa-2 e MCF-7, respectivamente. Os menores valores de IS, de 0,23; 0,49 e 0,52 foram observados para as AgNP-ER nas células MDA-MB-231, MCF-7 e MIA PaCa-2, nessa ordem. O antitumoral cisplatina (controle positivo) apresentou baixo IS em todos os tempos analisados, sendo mais citotóxico para as células normais do que as AgNPs testadas. Os dados da análise de citotoxicidade foram utilizados para definição da célula-alvo e nanopartícula efetiva e continuidade do estudo.

Tabela 1- Concentrações que inibem a proliferação em 50% nas células tumorais (IC50) MIA PaCa-2 e MCF-7 e nas células normais FN1 (CC50) em 24 h, e valores dos IS calculados.

Células	Tratamentos	IC50 (mM)	CC50 (mM)	IS=CC50/IC50
MIA PaCa-2	AgNP-AT	< 0,015 (<1,62)	0,014 (1,51)	> 0,93
	AgNP-BO	0,014 (1,51)	0,053 (5,72)	3,78
	AgNP-ER	0,014 (1,51)	0,007 (0,75)	0,52
	AgNP-FP	< 0,015 (<1,62)	< 0,015 (<1,62)	< 1
MCF-7	AgNP-AT	< 0,015 (<1,62)	0,049 (5,28)	> 3,26
	AgNP-BO	0,029 (3,12)	0,053 (5,72)	1,82
	AgNP-ER	0,015 (<1,62)	0,007 (0,75)	0,46
	AgNP-FP	0,009 (0,97)	< 0,015 (<1,62)	< 1,66

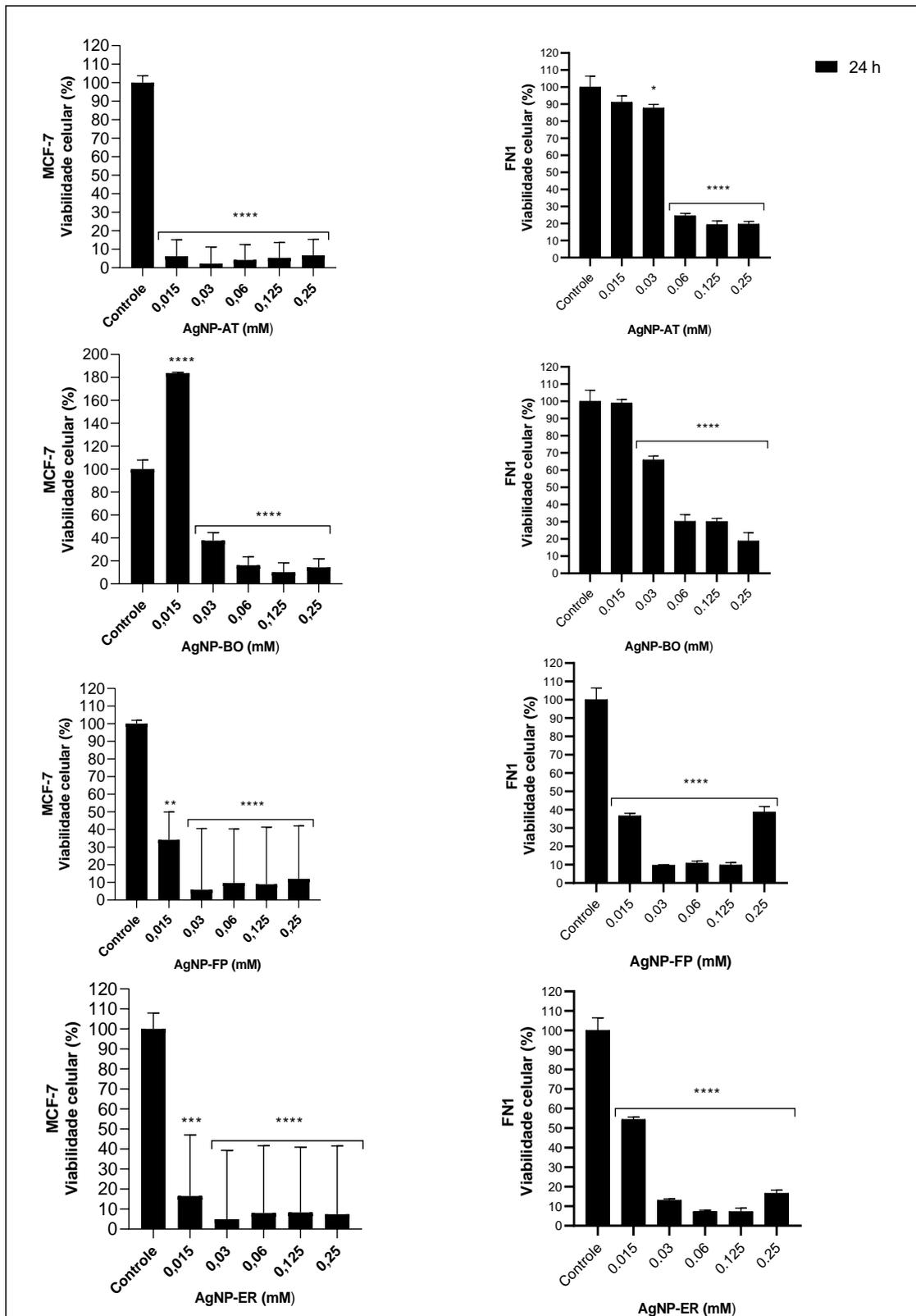
Fonte: Autoral (2023). Valores nos parênteses indicam as concentrações em µg/mL

Figura 1- Gráficos de citotoxicidade das nanopartículas AgNP-AT, AgNP-BO, AgNP-ER e AgNP-FP em fibroblastos humanos normais (FN1) e células tumorais MIA PaCa-2 após tratamentos por 24 h. Análise estatística realizada utilizando o software GraphPad Prism 8.0 por One-way ANOVA e teste de Dunnett (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). Controle = RPMI 1640. Os resultados representam a média de um ensaio realizados em sextuplicatas.



Fonte: Autoral (2023).

Figura 2- Gráficos de citotoxicidade das nanopartículas AgNP-AT, AgNP-BO, AgNP-ER e AgNP-FP em fibroblastos humanos normais (FN1) e células tumorais MCF-7 após tratamentos em 24 h. Análise estatística realizada utilizando o software GraphPad Prism 8.0 por One-way ANOVA e teste de Dunnett (* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001). Controle = RPMI 1640. Os resultados representam a média de um ensaio realizados em sextuplicatas.



Fonte: Autoral (2023).

5.3 CITOTOXICIDADE DAS AgNP EM CÉLULAS MDA-MB-231

Todas as nanopartículas (AgNP-Asp, AgNP-AT, AgNP-BO, AgNP-CPP, AgNP-EN, AgNP-ER e AgNP-FP) foram citotóxicas para as células MDA-MB-231, em concentrações de 0,015 a 0,25 mM (Figuras 3, 4). No entanto, em geral, às 72 h, a citotoxicidade das AgNPs não foi muito expressiva e houve interessante recuperação da viabilidade celular, principalmente nas menores concentrações, até 0,06 mM. Em células FN1 observou-se que em 72 h as menores concentrações, até 0,125 mM, no geral, não foram citotóxicas, quanto em 24 e 48 h.

Considerando os resultados de citotoxicidade nas linhagens tumorais MCF-7, MIA Paca-2 e MDA-MB 231, e a importância médica do adenocarcinoma de mama humano TNBC, a célula MDA-MB-231 foi selecionada como alvo para continuidade do estudo.

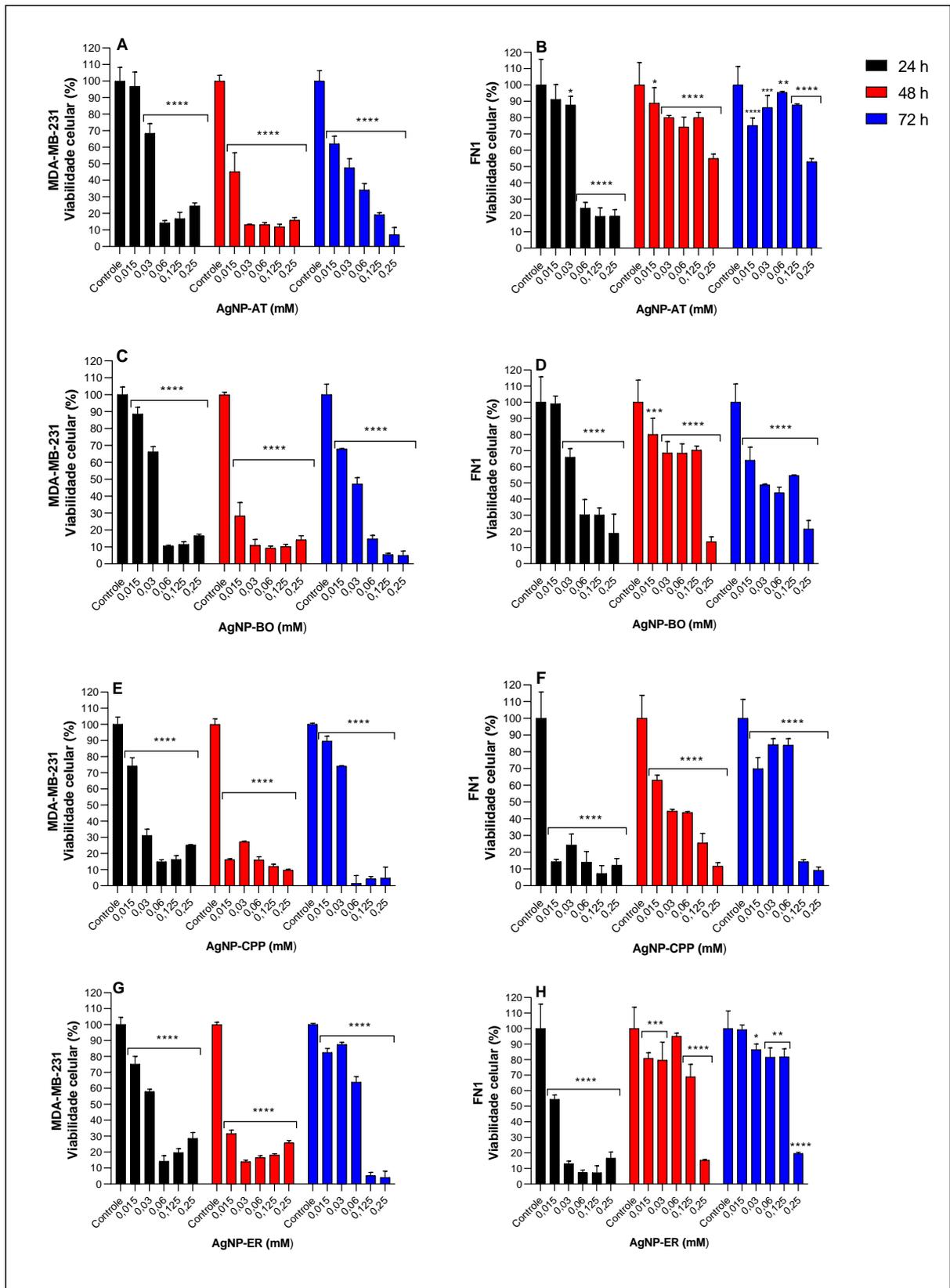
Ao avaliar o potencial citotóxico de todas as AgNPs nas células tumorais nos diferentes tempos, observou-se que as concentrações de inibição em 50% mais eficazes foram encontradas após 48 h para AgNP-BO (0,002 mM) e AgNP-AT (0,003 mM). Além disso, considerando o IS, que indica a taxa de seletividade das AgNPs para células tumorais, as AgNPs mais promissoras foram AgNP-AT, AgNP-BO, AgNP-Asp e AgNP-ER, avaliadas em 48 h, as quais apresentaram IS de 85,20; 61,38, 52,13 e 10,48, respectivamente, conforme demonstrado na Tabela 2.

As demais AgNPs foram citotóxicas para as células FN1, mas não na mesma intensidade que para as células tumorais. Apesar das AgNP-CPP e AgNP-EN serem citotóxicas para células tumorais MDA-MB-231, em 24 h houve maior citotoxicidade para FN1 (Figuras 3, 4), e ambas AgNPs obtiveram CC50 menor que 0,015 mM. Da mesma forma, a AgNP-ER mostrou CC50 de 0,007 mM. Também em 24 h, a AgNP-FP apresentou IC50 de 0,045 mM para células tumorais e CC50 inferior a 0,015 mM para fibroblastos normais. O IC50 para AgNP-Asp em células MDA-MB-231 foi de 0,104 mM e 3,3 vezes maior para células normais (CC50 de 0,346 mM).

O antitumoral cisplatina apresentou baixos valores de IS em todos os tempos analisados, sendo mais citotóxico para fibroblastos do que as AgNPs testadas, exceto AgNP-CPP que em 48 h apresentou IS inferior a 1,95, enquanto a cisplatina apresentou IS de 2,66 (Tabela 2).

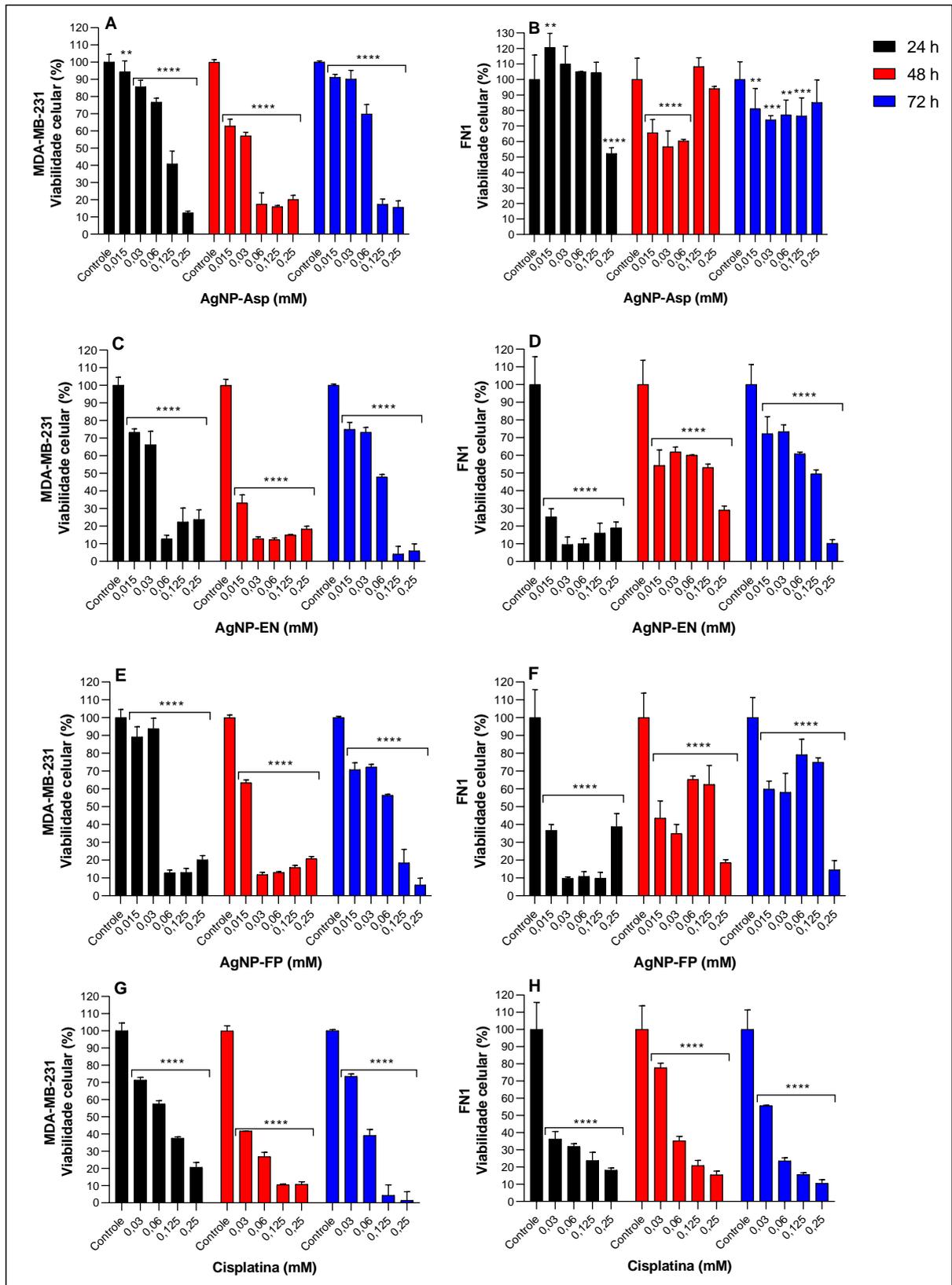
Em conclusão, os resultados indicam que as AgNP-AT e AgNP-BO apresentaram eficácia em todos os tempos de tratamento, sendo mais citotóxicas para as células tumorais MDA-MB-231 do que para as células normais FN1, conforme evidenciado pelos valores de IC50 e IS. Notavelmente, os valores de IS foram significativamente mais altos e destacados na Tabela 2, sugerindo maior especificidade das AgNP-AT em particular, com IS de 1,31; 85,20 e 5,47 em 24, 48 e 72 h, respectivamente, seguida por AgNP-BO com IS de 1,48; 61,38 e 0,90 nos mesmos tempos de tratamento.

Figura 3- Representação gráfica da viabilidade de células tumorais MDA-MB-231 e fibroblastos humanos normais FN1, após tratamentos com AgNP-AT, AgNP-BO, AgNP-CPP e AgNP-ER por 24, 48 e 72 h. Análise estatística realizada utilizando o software GraphPad Prism 8.0 e One-way Anova, seguido do teste de Dunnett (* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001). Controle = RPMI 1640. Os resultados representam a média de três ensaios independentes realizados em sextuplicatas.



Fonte: Autoral (2023).

Figura 4- Representação gráfica da viabilidade de células tumorais MDA-MB-231 e células fibroblásticas humanas normais FN1, após tratamentos com AgNP-EN, AgNP-FP, AgNP-Asp e cisplatina como controle positivo, em 24, 48 e 72 h. Análise estatística realizada utilizando o software GraphPad Prism 8.0 e One-way Anova seguido pelo teste de Dunnett (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). Controle = RPMI 1640. Os resultados representam a média de três ensaios independentes realizados em sextuplicatas.



Fonte: Autoral (20223).

Tabela 2- Concentrações de AgNPs que inibem o crescimento de células tumorais MDA-MB-231 em 50% (IC50) e fibroblastos humanos normais FN1 (CC50). Valores do índice de seletividade (IS= CC50/IC50).

Tratamentos	Tempo (h)	IC50 (MDA-MB-231)	CC50 (FN1)	IS=CC50/IC50
		IC50 (mM, µg/mL)	CC50 (mM, µg/mL)	
AgNP-AT	24	0,038 (4,09)	0,050 (5,34)	1,31
	48	0,003 (0,27)	0,213 (22,97)	85,20
	72	0,047 (5,08)	0,258 (27,81)	5,47
AgNP-BO	24	0,036 (3,88)	0,053 (5,76)	1,48
	48	0,002 (0,17)	0,098 (10,59)	61,38
	72	0,041 (4,45)	0,037 (4,02)	0,90
AgNP-ER	24	0,032 (3,48)	0,007 (0,80)	0,23
	48	< 0,015 (<1,62)	0,157 (16,96)	> 10,48
	72	0,067 (7,26)	0,189 (20,38)	2,81
AgNP-FP	24	0,045 (4,84)	< 0,015 (<1,62)	< 0,33
	48	0,018 (1,90)	0,027 (2,87)	1,51
	72	0,053 (5,73)	0,096 (10,30)	1,80
AgNP-EN	24	0,035 (3,79)	< 0,015 (<1,62)	< 0,43
	48	< 0,015 (<1,62)	0,061 (6,58)	> 4,07
	72	0,049 (5,30)	0,076 (8,21)	1,55
AgNP-CPP	24	0,021 (2,21)	< 0,015 (<1,62)	<0,73
	48	< 0,015 (<1,62)	0,029 (3,16)	> 1,95
	72	0,035 (3,77)	0,085 (9,17)	2,43
AgNP-Asp	24	0,104 (11,26)	0,346 (37,35)	3,32
	48	0,025 (2,72)	1,319 (142,27)	52,13
	72	0,337 (36,30)	0,372 (40,88)	1,11
Cisplatina	24	0,076 (8,24)	0,008 (0,83)	0,10
	48	0,020 (2,13)	0,053 (5,68)	2,66
	72	0,048 (5,13)	0,031 (3,34)	0,65

Fonte: Autoral (2023).

5.4 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Considerando a alta citotoxicidade nas células MDA-MB-231 e os excelentes valores de IS, foi realizado um estudo para avaliar o efeito das AgNP-AT nas diferentes fases do ciclo dessas células, e em fibroblastos normais FN1, nos tempos de 24, 48 e 72 h. Em resumo, as fases do ciclo celular, conhecidas como G0/G1, S e G2/M, representam os diferentes eventos de desenvolvimento e crescimento celular, replicação do DNA e divisão celular, respectivamente.

Como representado nas Figuras 5-7, as nanopartículas AgNP-AT causaram alterações significativas no perfil do ciclo celular de ambas as células analisadas. No caso das células FN1, foi observada uma modificação no ciclo celular, principalmente após 24 h de tratamento. No entanto, notou-se que após 48 e 72 h, o ciclo dessas células apresentou semelhanças com o grupo não tratado (controle), conforme evidenciado na Figura 5 e 6.

Em suma, as AgNPs induziram um aumento estatisticamente significativo na população celular de FN1 na fase S, e uma redução na porcentagem de células na fase G0/G1 após 24 h

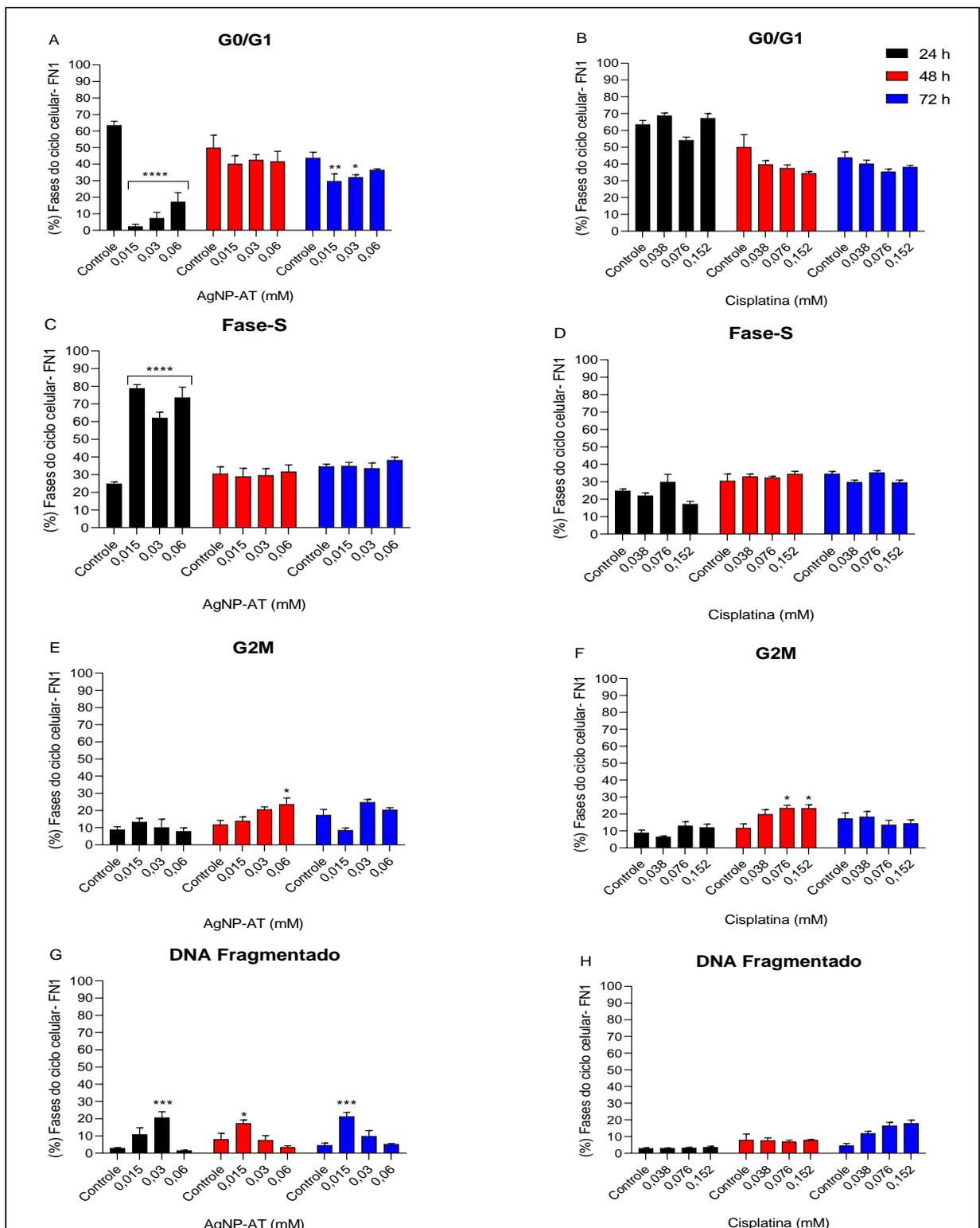
de tratamento, para todas as três concentrações avaliadas. Notavelmente, em comparação com as concentrações de 0,03 mM e 0,015 mM, a maior concentração de 0,06 mM resultou em redução menos acentuada na fase G0/G1. O aumento na porcentagem de células na fase S é consistente com a redução na fase G0/G1. Esses resultados sugerem que o processo de síntese e/ou duplicação do DNA foi afetado pela ação das AgNPs nas células normais.

Não houve alteração das células na fase G2M, que permaneceram com porcentagens semelhantes ao controle não tratado, e baixa porcentagem de células fragmentadas (DNA fragmentado) (Figura 5A, C).

Para as células MDA-MB-231, as AgNP-AT apresentaram efeito semelhante ao do antitumoral cisplatina. As AgNP-AT induziram um aumento na população de células na fase S para todas as três concentrações testadas nos três tempos avaliados. Por outro lado, houve uma diminuição na população de células na fase G0/G1 em comparação com o grupo controle não tratado, principalmente em 72 h (Figura 7 e 8). As células na fase G2/M apresentaram uma porcentagem similar ao controle, com exceção da concentração de 0,015 mM em 24 h, que apresentou um aumento.

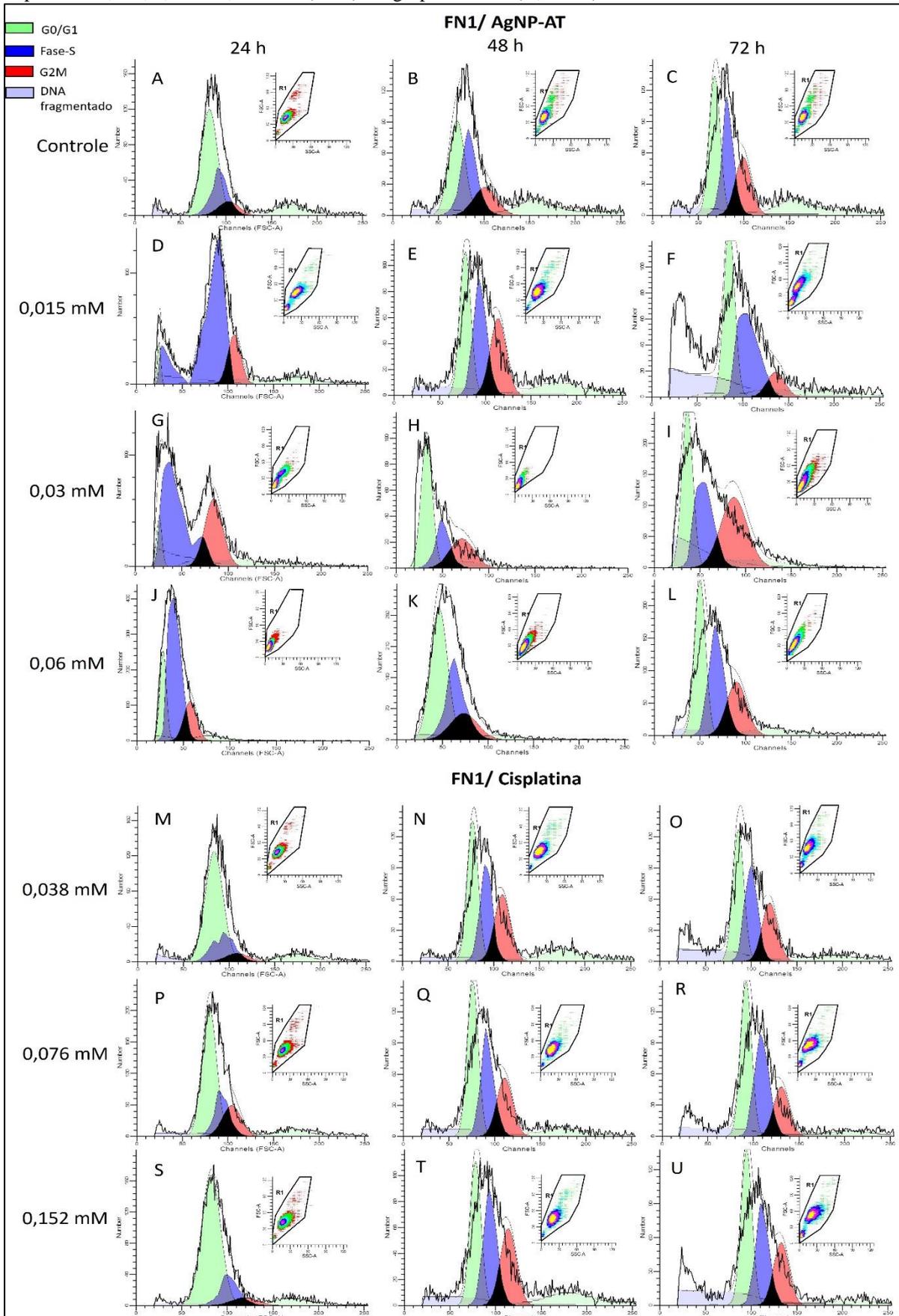
As células MDA-MB-231 tratadas com a cisplatina também mostraram uma diminuição na fase G0/G1 e um aumento na porcentagem de células na fase S (Figura 7A, C).

Figura 5- Representação gráfica da porcentagem de distribuição de fibroblastos normais humanos FN1 nas diferentes fases do ciclo celular nos tempos de 24, 48 e 72 h após tratamento com as AgNP-AT a 0,015; 0,03 e 0,06 mM (A, C, E, G), ou com cisplatina a 0,038; 0,076 e 0,152 mM (B, D, F, H). Análise estatística por ANOVA one-way/teste de comparação múltipla de Turkey (*P = 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes realizados em sextuplicatas.



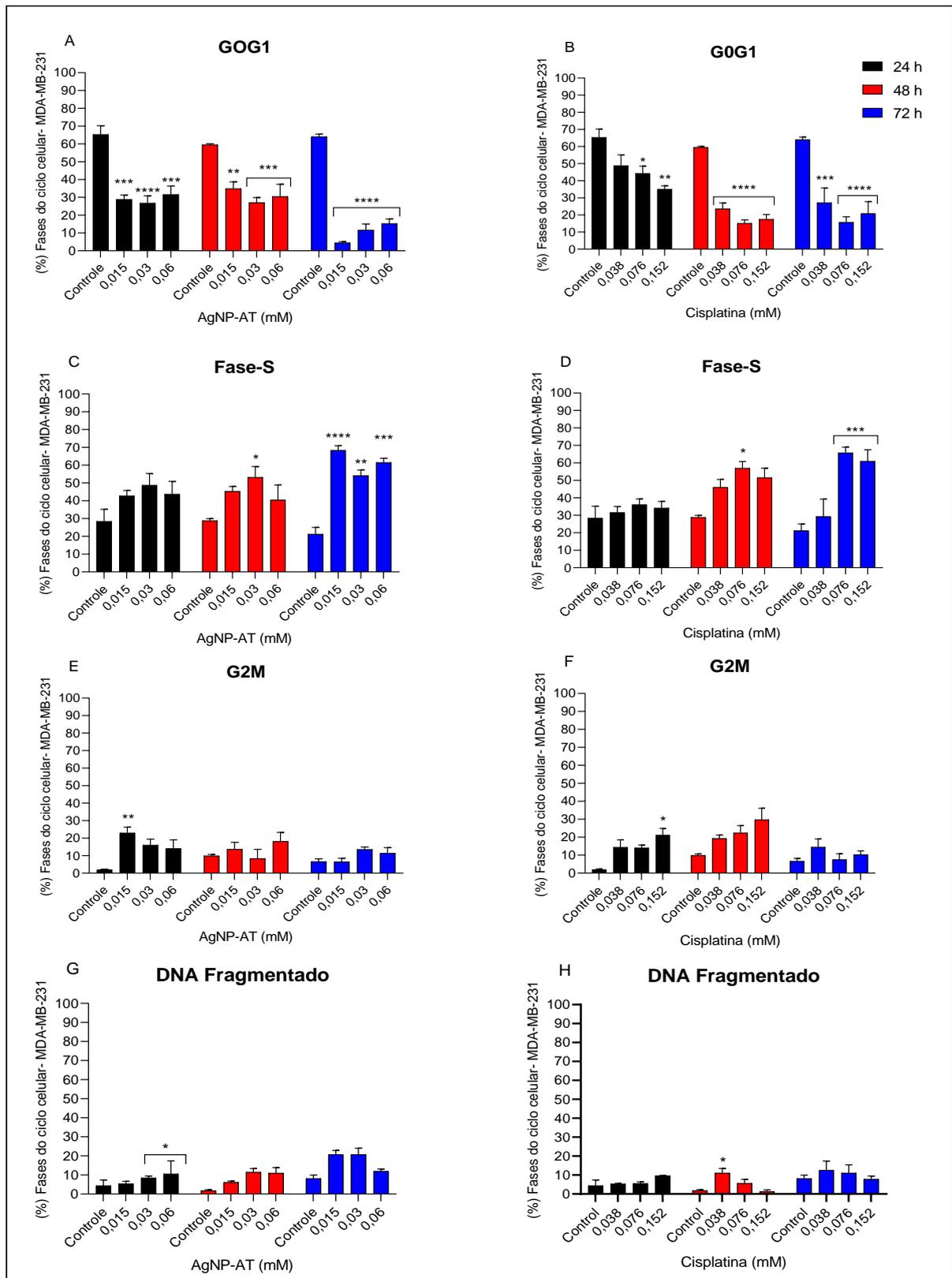
Fonte: Autoral (2023).

Figura 6- Histogramas representativos da distribuição dos fibroblastos normais FN1 nas diferentes fases do ciclo celular nos tempos de 24, 48 e 72 h após tratamento com as AgNP-AT a 0,015; 0,03 e 0,06 mM (D-L), ou com cisplatina a 0,038; 0,076 e 0,152 mM (M-U) e o grupo controle (A, B e C).



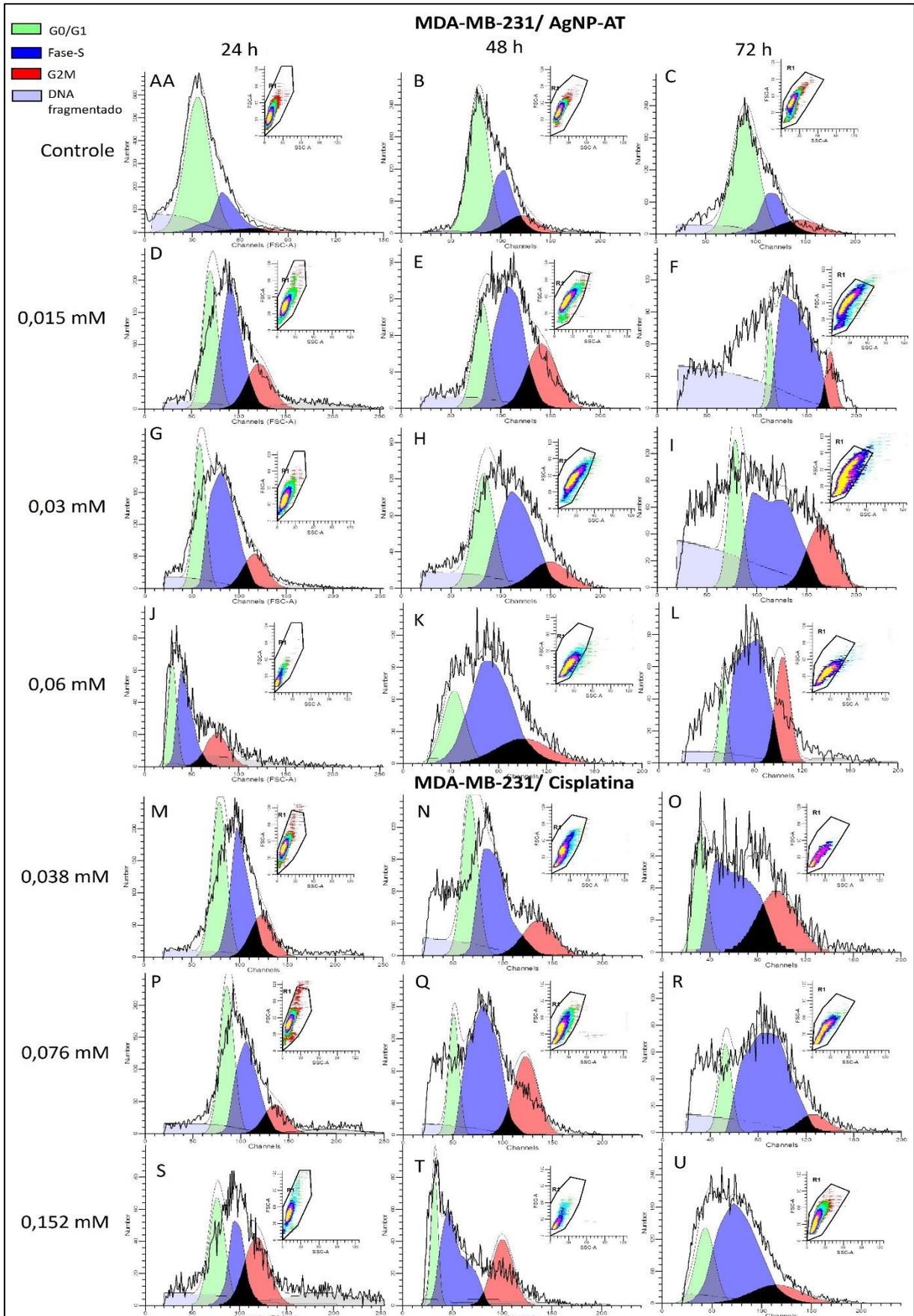
Fonte: Autoral (2023).

Figura 7- Representação gráfica da distribuição das células tumorais MDA-MB-231 nas diferentes fases do ciclo celular nos tempos de 24, 48 e 72 h após tratamento com as AgNP-AT a 0,015; 0,03 e 0,06 mM (A, C, E, G), ou com cisplatina a 0,038; 0,076 e 0,152 mM (B, D, F, H). Análise estatística por ANOVA one-way/teste de comparação múltipla de Turkey (*P = 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes realizados em sextuplicatas.



Fonte: Autoral (2023).

Figura 8- Histogramas representativos da distribuição das células tumorais MDA-MB-231 nas diferentes fases do ciclo celular nos tempos de 24, 48 e 72 h após tratamento com as AgNP-AT a 0,015; 0,03 e 0,06 mM (D-L), ou com cisplatina a 0,038; 0,076 e 0,152 mM (M-U) e o grupo controle (A, B e C).



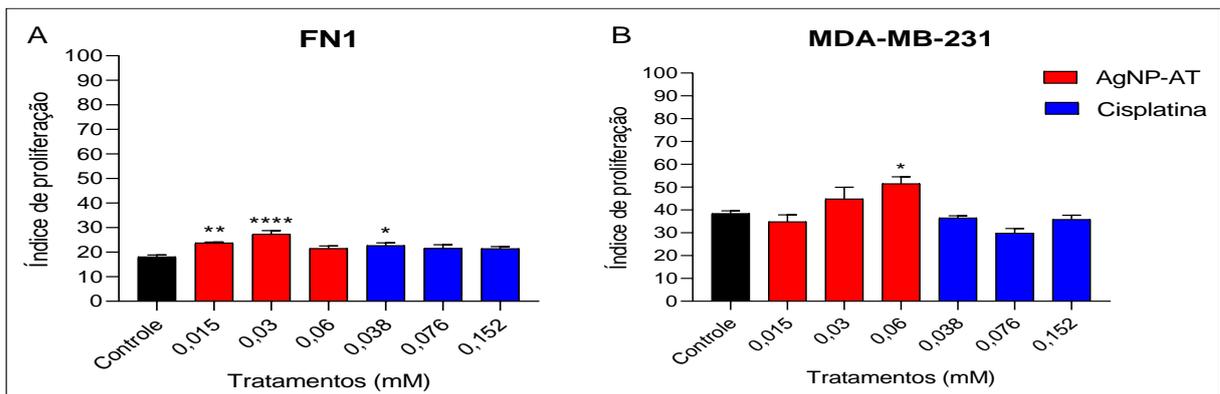
Fonte: Autoral (2023).

5.5 DETERMINAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Os índices de proliferação em células FN1 indicam que as AgNP-AT nas concentrações de 0,015 mM e 0,03 mM aumentaram a proliferação em 31 e 51%, respectivamente, em comparação ao grupo controle (Figura 9A, 10).

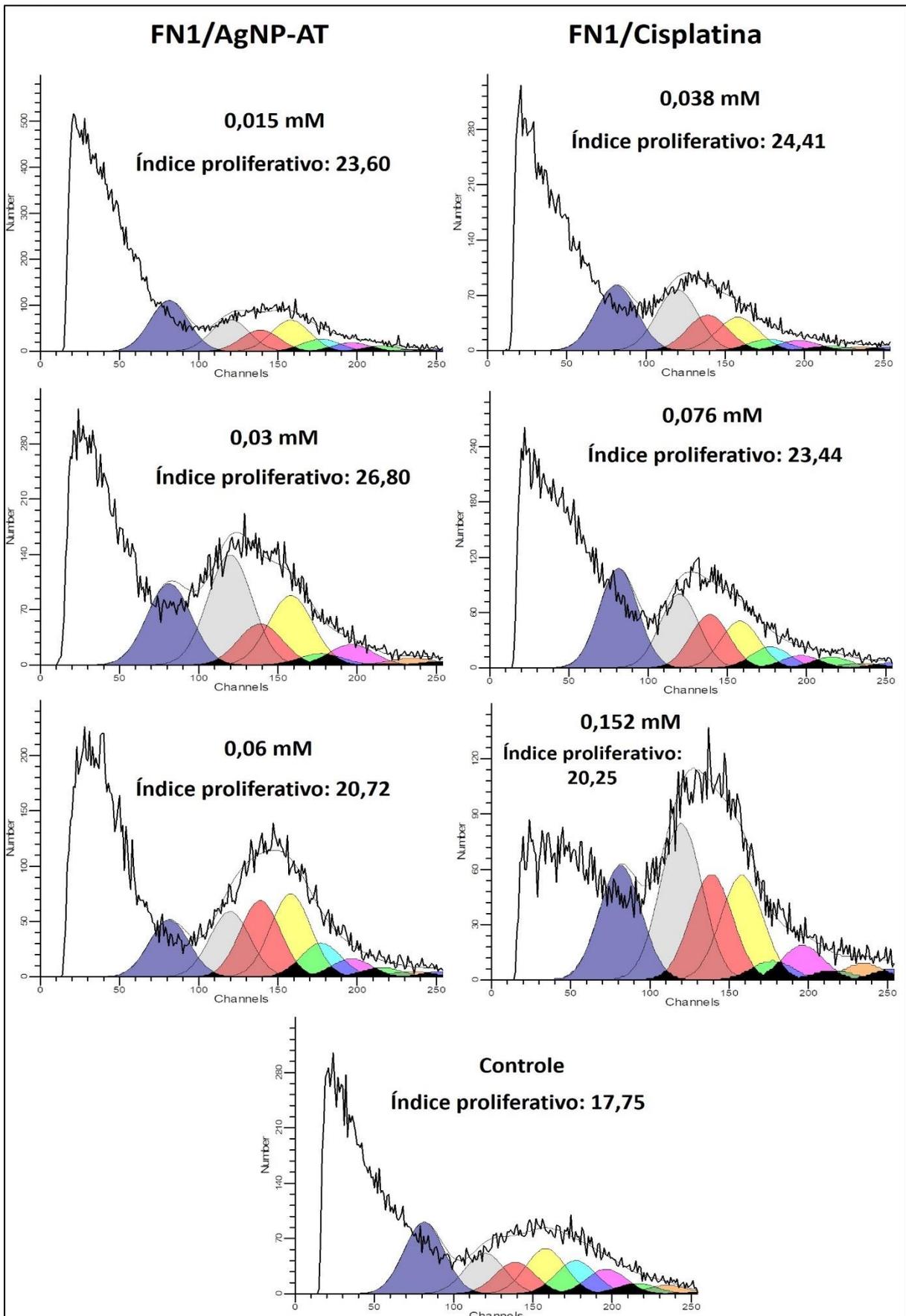
Em células MDA-MB-231, o grupo tratado com AgNP-AT a 0,06 mM apresentou proliferação celular 11,7% superior em relação ao grupo controle (Figura 9B, 11), enquanto com 0,015 mM embora não tenha sido estatisticamente significativa houve diminuição de 9,6% na proliferação celular. Por outro lado, o antitumoral cisplatina não apresentou alterações significativas na proliferação das células FN1 e MDA-MB-231, com exceção da concentração de 0,038 mM em FN1, que aumentou em 25% (Figura 9A, 10). É importante ressaltar que em todos os tempos analisados, a cisplatina diminuiu a proliferação das células MDA-MB-231, evidenciando seu potencial antitumoral.

Figura 9- Gráfico do índice de proliferação das células (A) FN1 e (B) MDA-MB-231 tratadas com AgNP-AT a 0,015; 0,03 ou 0,06 mM, e cisplatina a 0,038; 0,076 e 0,152 mM, e grupo controle não tratado, por 24 h. Análise estatística por ANOVA one-way/teste de comparação múltipla de Turkey (*P = 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes realizados em sextuplicatas.



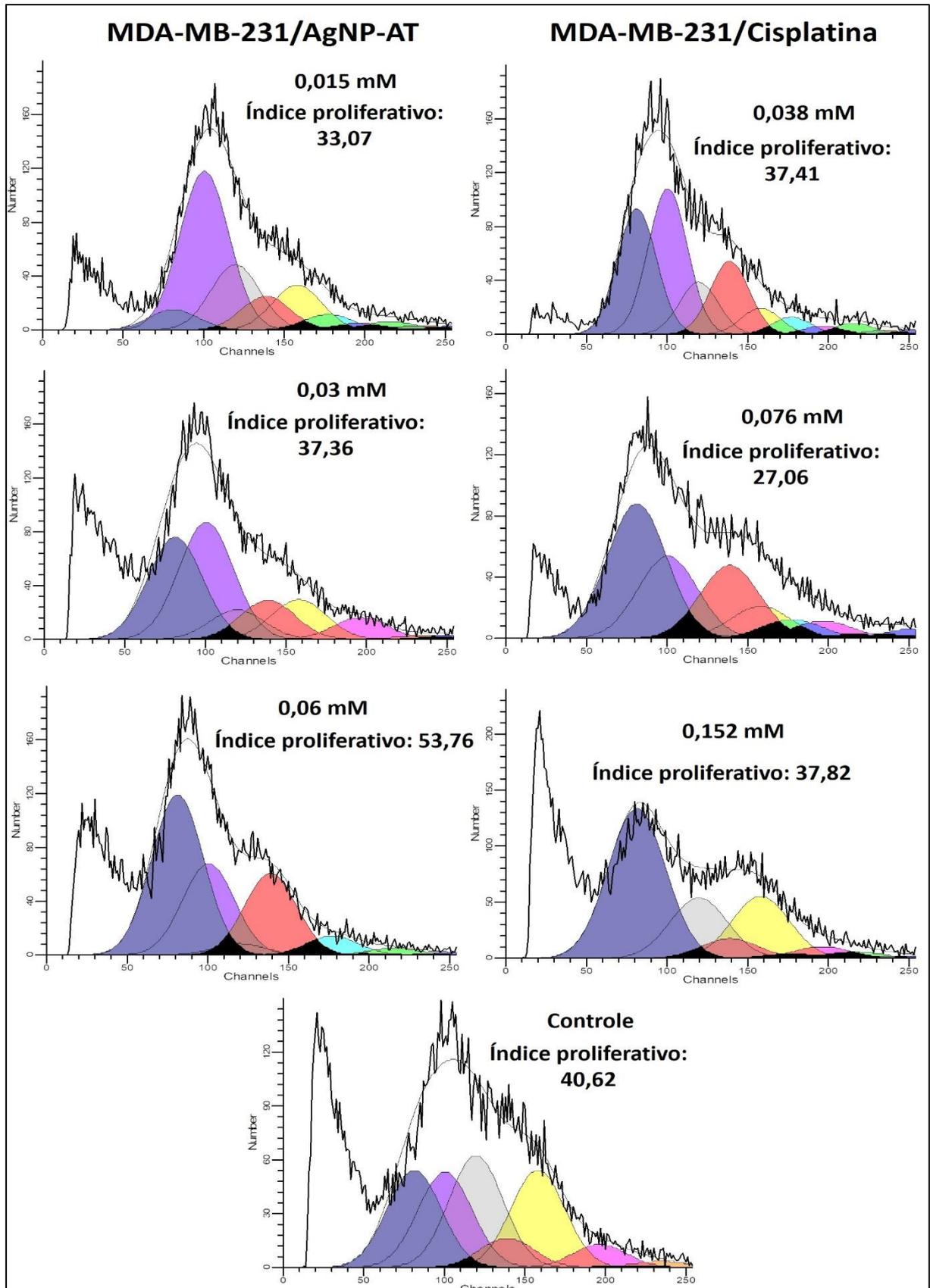
Fonte: Autoral (2023).

Figura 10- Histogramas representativos da proliferação celular dos Fibroblastos normais no tempo de 24 h após tratamento com as AgNP-AT a 0,015; 0,03 e 0,06 mM ou com cisplatina a 0,038; 0,076 e 0,152 mM e o grupo controle.



Fonte: Autoral (2023).

Figura 11- Histogramas representativos da proliferação celular das células tumorais MDA-MB-231 no tempo de 24 h após tratamento com as AgNP-AT a 0,015; 0,03 e 0,06 mM ou com cisplatina a 0,038; 0,076 e 0,152 mM e o grupo controle.



Fonte: Autoral (2023).

5.6 INDUÇÃO DE APOPTOSE/NECROSE - MARCAÇÃO COM ANEXINA V/ IODETO DE PROPÍDEO

A apoptose inicial e tardia, e a necrose são fases distintas do processo de morte celular programada. Na fase inicial da apoptose, as células começam a demonstrar indícios de dano celular. Há modificações na morfologia, que pode incluir uma contração celular, condensação de cromatina e a formação de corpos apoptóticos, que são estruturas celulares fragmentadas, porém a membrana permanece íntegra. Progressivamente, a célula avança para a fase de apoptose tardia. Neste estágio, as células já passaram por mudanças mais severas na sua morfologia e estrutura. A membrana plasmática começa a distorcer e a criar estruturas em forma de "bolhas", conhecidas por "blebs". A cromatina continua a se condensar e a fragmentar-se, e as organelas celulares podem também ser fragmentadas. Este processo antecede a fagocitose por células vizinhas ou células imunológicas especializadas. Na fase de necrose, a célula é desintegrada e pode ser eliminada do tecido. A membrana celular se rompe completamente, e o conteúdo celular é liberado para o ambiente extracelular. As estruturas fragmentadas são então fagocitadas por células fagocíticas, como os macrófagos, e excluídas do local. Esse processo de remoção impede que as substâncias celulares liberadas provoquem uma reação inflamatória indesejada no tecido circundante (PAQUET; PIERARD, 2007).

O ensaio de anexina V é um método eficiente monitorar esse processo e foi utilizado nesse estudo. A anexina V se liga à fosfatidilserina presente na superfície externa das células que estão passando por apoptose e o iodeto de propídio se liga ao DNA, mas só consegue entrar em células com integridade da membrana comprometida (KABAKOV; GABAI, 2018).

Os resultados revelaram que as AgNP-AT aumentaram os níveis de células MDA-MB-231 em estágio inicial de apoptose em 1,7 vezes na concentração de 0,03 mM (IC50) em comparação ao grupo controle, sem alteração significativa em células normais (Figura 12, Tabela 3). A exposição a 0,06 mM das AgNP-AT aumentou em 8,2 vezes o número de células tumorais em estágio de necrose tardia e apoptose (Figura 12, Tabela 3). Por outro lado, o tratamento das células MDA-MB-231 com o antitumoral cisplatina a 0,076 mM (IC50) resultou em redução de 46% no número de células em estágio inicial de apoptose.

Em fibroblastos normais, as AgNP-AT promoveram um aumento na taxa de necrose em 1,4 vezes em relação ao grupo controle, enquanto o antitumoral cisplatina causou uma taxa de necrose 4,6 vezes superior (Figura 12, Tabela 3). Além disso, a cisplatina afetou o número de fibroblastos normais viáveis de maneira dependente da dose, enquanto as AgNP-AT não apresentaram alterações significativas nesse índice.

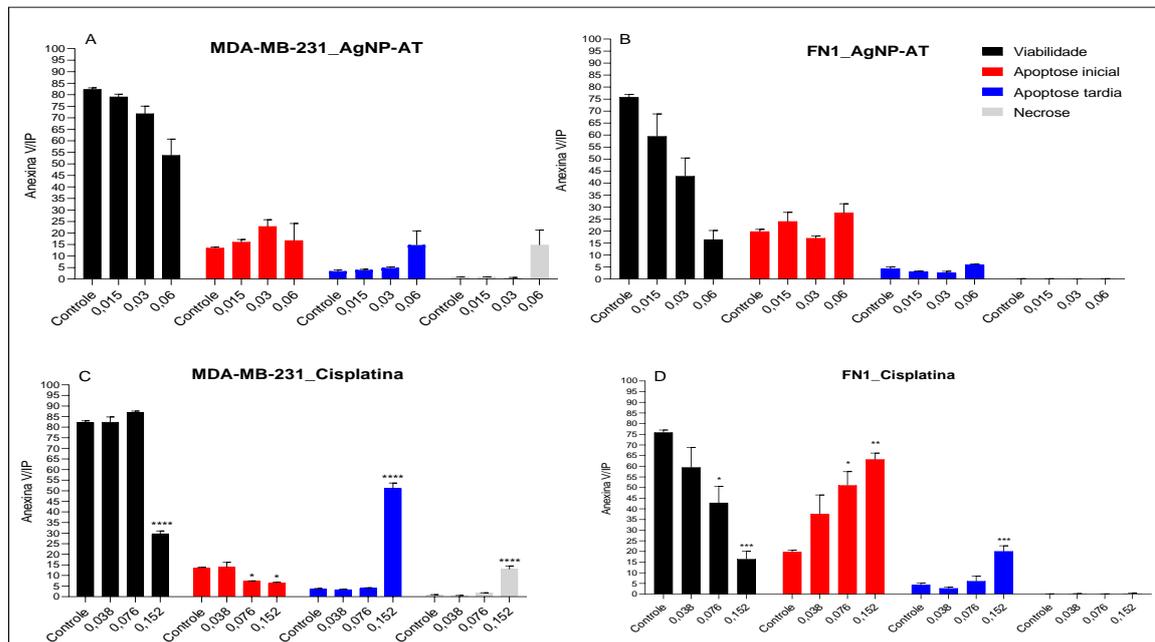
Tabela 3- Porcentagem de células MDA-MB-231 e FN1 viáveis, em necrose e em apoptose inicial e tardia após tratamentos com AgNP-AT por 24 horas e marcação de anexina V/IP (média \pm SEM) (n=6).

Tratamentos	Viabilidade	Necrose	Apoptose inicial	Apoptose tardia
MDA-MB-231/FN1				
Controle	82,3 \pm 0,7/75,8 \pm 1,2	0,8 \pm 0,1/0,13 \pm 0,0	13,4 \pm 0,5/19,8 \pm 0,9	3,4 \pm 0,4/4,3 \pm 0,7
AgNP-AT (mM)				
0,015	79,0 \pm 1,1/59,4 \pm 9,4	0,9 \pm 0,0/0,15 \pm 0,0	16,1 \pm 1,1/23,9 \pm 3,8	3,9 \pm 0,2/3,1 \pm 0,3
0,03	71,7 \pm 3,3/42,8 \pm 7,7	0,6 \pm 0,4/0,1 \pm 0,0	22,8 \pm 3,0/16,9 \pm 1,0	4,8 \pm 0,4/2,6 \pm 1,0
0,06	53,7 \pm 7,0/16,4 \pm 0,0	14,7 \pm 6,4/0,15 \pm 0,0	16,7 \pm 7,3/27,5 \pm 3,8	14,7 \pm 6,1/5,9 \pm 0,3
Cisplatina (mM)				
0,038	82,8 \pm 2,4/59,4 \pm 9,4	0,5 \pm 0,0/0,2 \pm 0,0	13,8 \pm 2,3/37,5 \pm 8,9	3,3 \pm 0,2/2,7 \pm 0,6
0,076	87,0 \pm 0,5/42,7 \pm 7,6	1,8 \pm 0,0/0,1 \pm 0,0	7,3 \pm 0,2/51,0 \pm 6,4	3,9 \pm 0,3/6,0 \pm 2,5
0,152	29,7 \pm 1,4/16,4 \pm 3,8	13,0 \pm 1,5/0,4 \pm 0,1	6,3 \pm 0,6/63,1 \pm 3,0	51,0 \pm 2,5/20,0 \pm 2,6

*Cisplatina usada como controle positivo

Fonte: Aural (2023).

Figura 12- Porcentagem de células viáveis, em necrose e em apoptose precoce ou tardia. Células MDA-MB-231(A, C) ou FN1 (B, D) após tratamento com 0,015, 0,03, 0,06 mM de AgNP-AT ou 0,038, 0,076 ou 0,152 mM de antitumoral cisplatina, por 24 h. O controle representa células não tratadas que receberam apenas meio RPMI-1640 isento de soro. Os dados foram calculados utilizando o software GraphPad Prism 8.0 e análise estatística One-way Anova, seguido pelo teste de Dunnett (* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001). Controle = RPMI 1640. Os resultados representam a média de um ensaio realizados em sextuplicatas.



Fonte: Aural (2023).

5.7 ENSAIO DE MUTAGÊNESE CROMOSSÔMICA

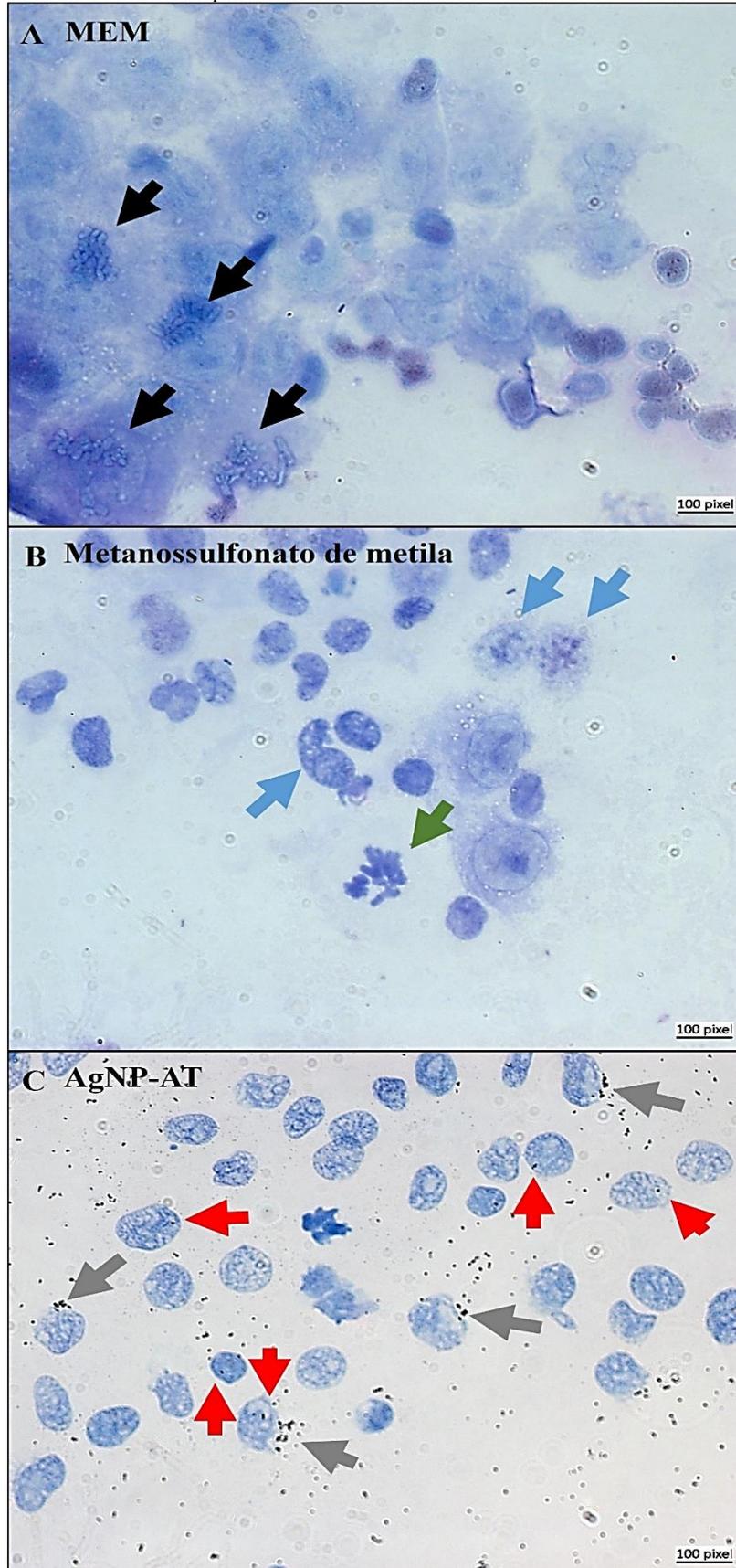
A análise de possíveis danos cromossômicos causados pela AgNP-AT foi realizada em células V79-4. A presença de mais de dois centrômeros em cada cromossomo quebra e trocas

de cromátides são consideradas aberrações cromossômicas (NATARAJAN et al., 2008). O ensaio foi realizado para AgNP-AT em células V79-4 seguindo o procedimento da OECD 473.

As células V79-4 utilizadas como controle e que receberam apenas meio de cultura MEM apresentaram cromossomos normalmente empacotados, organizados e inalterados, conforme pode ser observado na Figura 13C. O controle positivo com MMS a 2 μ M, utilizado como referência, induziu alterações na morfologia celular e tamanho do cromossomo, danos à estrutura cromátide e centrômeros irregulares (Figura 13B).

A análise microscópica indica a presença de AgNP-AT ao redor da membrana celular e no meio intracelular (Figura 13A), no entanto, as AgNP-AT não causaram alterações na morfologia celular.

Figura 13- Micrografias da análise de mutagênese em células V79-4 coradas com Giemsa a 5% para os grupos tratados com AgNP-AT a 0,03 mM (A), metanossulfonato de metila (MMS) (controle positivo) (B), e controle não tratado (C). Setas cinzas: AgNPs ao redor da membrana celular externa; setas vermelhas: presença de AgNPs no meio intracelular; setas azuis: alteração na morfologia celular; setas verdes: cromossomos danificados; setas pretas: cromossomos normalmente compactados. Barra em 100 nm.



Fonte: Autorial (2023).

6 DISCUSSÃO

A biossíntese de AgNPs usando espécies de fungos tem se mostrado um método eficiente para obtenção de nanopartículas uniformes e estáveis com aplicações distintas (SINGH et al., 2017; RODRIGUES et al., 2013, 2021; RAI et al., 2021).

Nesse estudo, a formação de AgNPs biogênicas ocorreu por via extracelular, utilizando as espécies de *A. tubingensis* (AgNP-AT), *B. ochroleuca* (AgNP-BO), *Aspergillus spp* (AgNP-Asp), *E. nigrum* (AgNP-EN), *F. proliferatum* (AgNP-FP), *C. pini-ponderosae* (AgNP-CPP) e *E. rostratum* (AgNP-ER) (RODRIGUES et al., 2013; RIBEIRO, et al., 2022).

A biossíntese dessas AgNPs é dependente de agentes redutores produzidos por cada espécie de fungo e presente no EA livre de células, conforme descrito na seção experimental. Essa rota de biossíntese é mais vantajosa e simples que a intracelular, evitando etapas para lise das células e extração das nanopartículas (DE SOUZA; RODRIGUES, 2015; BALLOTTIN et al., 2016; SINGH et al., 2017; RAI et al., 2021).

Anteriormente, descrevemos que as proteínas presentes no EA livre de células podem formar uma superfície de revestimento ao redor do núcleo das AgNPs evitando a agregação e favorecendo a estabilidade (BALLOTTIN et al., 2016). A estabilidade das AgNP-AT foi observada em nosso laboratório, mesmo após 4 anos de armazenamento em temperatura ambiente. O tamanho, morfologia, dispersão e atividade antimicrobiana foram mantidos sem nenhuma modificação (dados não publicados).

A formação de AgNPs foi observada pela mudança de cor das misturas reacionais de incolor para acastanhado. Essa mudança se dá, principalmente, pela presença da banda de RPS na região de 420 nm, conforme previamente descrito por Shaligram et al. (2009). Todas as AgNPs apresentaram formas predominantemente esféricas com formação de poucos agregados. Após 96 h de incubação, não houve aumento na intensidade da banda de RPS, indicando redução completa dos íons de prata neste tempo de reação.

Os tamanhos hidrodinâmicos das AgNPs variaram de $43,4 \pm 3,3$ a $120,6 \pm 3,5$ nm, sendo que as AgNP-AT e AgNP-Asp apresentaram os menores tamanhos de $43,4 \pm 3,3$ e $44,9 \pm 4,1$ nm, respectivamente. Além disso, a AgNP-AT apresentou o menor valor de PDI (0,080), indicando a uniformidade de tamanho das AgNPs. Os valores de PDI estão relacionados a uniformidade de tamanho, e quanto menor mais homogêneos. A Tabela 1 apresenta os tamanhos, os valores de PDI, potencial Zeta e pH das AgNPs utilizadas neste estudo.

A relação superfície/volume promove melhor absorção intracelular das AgNPs, que interagem de forma mais efetiva com o alvo molecular (GIL; PARAK, 2008; KIM et al., 2012). NPMs têm a carga superficial determinada pela presença de moléculas provenientes do EA usado na biossíntese e podem ser carregadas de forma negativa ou positiva. Essa característica

pode determinar a eficiência das NPMs em meio fisiológico. Carga positiva pode promover melhor interação com as células-alvo e maior tempo de retenção intracelular, e quando negativa pode ocorrer maior dispersividade com maior campo de ação (LEITE et al., 2012). Os resultados desse estudo mostraram que todas as AgNPs apresentaram valores de potencial Zeta negativo.

O potencial hidrogeniônico (pH) interfere no tamanho, forma, dispersão e revestimento das AgNPs e deve ser considerado na avaliação da ação citotóxica em meio fisiológico (SONI; PRAKASH; 2011; RIAZ et al., 2021). O pH fisiológico do sangue é próximo de 7,4 e, portanto, AgNPs com pH nesta faixa podem ser mais efetivas, principalmente devido à estabilidade intracelular. Neste contexto, dentre as AgNPs biossintetizadas os valores de pH mais interessantes, foram obtidos para AgNP-AT e AgNP-BO na faixa de 7,0-7,5 mostrando a possibilidade de interessante nano-bio-interação (DE SOUZA, 2023). Essas AgNPs já foram bem estudadas, e a caracterização foi descrita em detalhes quanto ao tamanho, carga superficial, forma, composição, potencial Zeta e revestimento por nosso grupo (RODRIGUES et al., 2013; DE SOUZA; RODRIGUES, 2015; BALLOTTIN et al., 2016; RIBEIRO et al., 2023).

De maneira geral, as AgNPs utilizadas neste estudo apresentaram propriedades físico-químicas adequadas a aplicação terapêutica. Sabe-se que o tamanho pequeno e homogêneo, e a baixa taxa de formação de agregados são interessantes para a interação de nanopartículas com células em sistemas biológicos (RODRIGUES et al., 2013; DE SOUZA; RODRIGUES, 2015; BALLOTTIN et al., 2016; RIBEIRO et al., 2023).

A proliferação das células tumorais MIA PaCa-2 e MCF-7 foi inibida em 24 h por ação dose-resposta com alto IS, quando expostas as AgNP-AT, AgNP-BO, AgNP-FP e AgNP-ER. Com destaque, as AgNP-AT inibiram o crescimento celular em 90% em todas as concentrações testadas (0,015; 0,03 e 0,06 mM), e a AgNP-BO promoveu inibição de 92 e 84% a 0,03 e 0,06 mM, para as células MIA PaCa-2 e MCF-7, respectivamente. Em um estudo conduzido por Abdellatif et al. (2022) foi observado que a citotoxicidade de AgNPs biossintetizadas usando *Trigonella foenum-graecum* com tamanho médio de $22,5 \pm 0,75$ nm e potencial Zeta negativo, não foi significativa para células MCF-7. Esse dado corrobora os demais resultados desse estudo evidenciando a excelente ação citotóxica de AgNPs provenientes de fungos, cujo revestimento proteico e características físico-químicas favorecem a captação e retenção dos íons de prata na célula tumoral provocando sua morte.

Considerando as evidências relatadas na literatura em relação à citotoxicidade das AgNPs, no presente estudo, as células TNBC MDA-MB-231 foram selecionadas como alvo para avaliar a citotoxicidade das AgNPs biossintetizadas por diferentes espécies de fungos isolados da biodiversidade brasileira.

Em 24 e 48 h, todas as AgNPs (AgNP-Asp, AgNP-AT, AgNP-BO, AgNP-CPP, AgNP-EN, AgNP-ER e AgNP-FP) foram citotóxicas para as células TNBC MDA-MB-231 em concentrações de 0,015 a 0,25 mM. No entanto, em 72 h, em geral, a citotoxicidade dos AgNPs não foi muito expressiva, mostrando uma interessante recuperação da viabilidade celular, principalmente nas menores concentrações, até 0,06 mM.

Em células FN1, em 72 h, no geral, as concentrações até 0,125 mM não foram citotóxicas. Um efeito semelhante foi observado anteriormente por nosso grupo para as AgNP-AT em células endoteliais HUVEC (OTTONI et al., 2019). Dentro de 72 h, pode ter ocorrido a recuperação do metabolismo celular, induzindo maior viabilidade celular do que em 24 e 48 h, ou a biodisponibilidade das AgNPs pode ter sido reduzida por degradação intracelular, conforme relatado anteriormente (SWANNER et al., 2019). A diminuição da biodisponibilidade das nanopartículas é perfeitamente possível após 72 h do tratamento das células, e este efeito é muito interessante, indicando que possivelmente após a interrupção do tratamento, as AgNPs são continuamente degradadas evitando acúmulo no local de sua aplicação e algum possível efeito adverso. A diminuição da biodisponibilidade de AgNPs pode estar relacionada à menor citotoxicidade em 72 h para as células tumorais, que podem se replicar rapidamente, aumentando a densidade populacional. No entanto, esta hipótese para as AgNPs deste estudo precisa ser confirmada por ensaios *in vivo*.

A concentração de AgNPs internalizadas parece não ser determinante para a citotoxicidade em células tumorais, mas a rápida degradação e consequente dano causado no meio intracelular são fatores importantes, uma vez que impedem a formação de metalotioneínas ou outros antioxidantes capazes de neutralizar a ação antitumoral das AgNPs (SWANNER et al., 2019). Em células TNBC a internalização de AgNPs por diferentes vias endocíticas (fagocitose, macropinocitose e endocitose) é um mecanismo determinante para a citotoxicidade. Nesse tipo de células, as AgNPs são rapidamente degradadas e levam a danos significativos às estruturas celulares (SWANNER et al., 2019). No entanto, a internalização de AgNPs nas células, diminui a disponibilidade, resultando em uma condição favorável para a proliferação. Portanto é importante determinar a meia-vida plasmática dos candidatos a fármacos para avaliar a biodisponibilidade.

As AgNPs foram citotóxicas para fibroblastos FN1, mas não com a mesma intensidade que nas células tumorais MDA-MB-231.

Embora AgNP-CPP e AgNP-EN tenham sido citotóxicas para as células tumorais MDA-MB-231, em 24 h também foram citotóxicas para fibroblastos FN1 apresentando CC50 menor que 0,015 mM. AgNP-ER apresentou IC50 de 0,032 mM e CC50 de 0,007 mM. Ao mesmo tempo, AgNP-FP apresentou IC50 de 0,045 mM para células tumorais e CC50 inferior

a 0,015 mM para fibroblastos normais. O IC50 para AgNP-Asp em células MDA-MB-231 foi de 0,104 mM e ~3,3 vezes maior para células normais (CC50 de 0,346 mM). Contudo, apesar de exibirem algum nível de citotoxicidade para células normais, as AgNPs mostraram-se mais seletivas para células tumorais. Essa seletividade pode ser atribuída ao revestimento das AgNPs, a maior biocompatibilidade, facilidade de captação pelas células tumorais, maior dispersividade com maior campo de ação e estabilidade no meio biológico.

Algotiml et al. (2022) demonstraram que AgNPs contendo revestimento proteico proveniente de *Ulva rigida* (algas verdes), *Cystoseira myrica* (algas marrons) ou de *Gracilaria foliifera* (algas vermelhas) apresentam 92,62; 92,13 e 85,74% de inibição da proliferação das células de câncer de mama MCF-7. Por outro lado, as AgNPs sintéticas não revestidas inibiram apenas 62% do crescimento dessas mesmas células.

Considerando o potencial citotóxico de todas as AgNPs nas células tumorais em 48 h, as mais interessantes foram AgNP-BO e AgNP-AT que apresentaram IC50 de 0,002 mM e 0,003 mM, respectivamente. No entanto, de acordo com o IS, destacam-se as AgNP-AT, AgNP-BO, AgNP-Asp, AgNP-ER, que apresentaram IS de 85,20; 61,38; 52,13 e 10,48, respectivamente.

De maneira geral, o antitumoral cisplatina apresentou baixos valores de IS em todos os tempos analisados, sendo mais citotóxico para os fibroblastos normais, quando comparado as AgNPs, exceto a AgNP-CPP que em 48 h, apresentou IS inferior a 1,95, enquanto a cisplatina apresentou IS de 2,66. Esses dados estão de acordo com dados da literatura para a cisplatina (FUERTES et al., 2012; HAN et al., 2017).

No contexto da ação citotóxica em células TNBC, pesquisadores revelaram que o perfil molecular desse tumor pode responder de maneira diferente ao tratamento com AgNPs sintéticas. Os resultados apontaram que doses letais para os tipos estratificado mesenquimal (câncer de mama com baixo teor de claudina - CLBC) BT-549, MDA-MB-231, MDA-MB-436 e SUM159, foram pouco citotóxicas sobre os subtipos epiteliais (câncer de mama tipo basal - BLBC) HCC70, BT-20 e MDA-MB-468, sem toxicidade aparente para as células epiteliais normais da mama. O estudo ainda destacou a igualdade de citotoxicidade em células TNBC e células epiteliais não malignas da mama quando expostas aos cátions de Ag⁺, indicando que a formulação de nanopartículas é essencial para a citotoxicidade específica a TNBC (SNYDER et al., 2021).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são apontadas como a via provável para o mecanismo de toxicidade de AgNPs em tumor de mama triplo-negativo MDA-MB-436. As AgNPs sintéticas de 20 ou 200 nm, na concentração de 25–100 µg/mL, foram citotóxicas para as células TNBC MDA-MB-436 de forma dose e tempo dependente, provocando alterações no

citoesqueleto das células (MATYSIAK-KUCHAREK et al., 2020). Similarmente, AgNPs provenientes de *Ganoderma neo-japonicum* com tamanhos variando de 2-100 nm, em concentração de 5 a 25 µg/mL, foram citotóxicas de maneira dose-dependente sobre células tumorais de câncer mama TNBC MDA-MB-231. No referido estudo, foi observado que as AgNPs provocaram ativação da lactato desidrogenase (LDH), caspase-3 e geração de ROS, e apoptose (GURUNATHAN et al., 2013).

Muitos estudos sugerem que as AgNPs biogênicas são uma opção mais eficaz e segura para o tratamento do TNBC do que as AgNPs sintéticas. Embora as AgNPs biogênicas apresentem muitas vantagens em relação às sintéticas, o uso no tratamento do câncer, assim como para outras finalidades deve ser padronizado com nanopartículas sempre do mesmo tamanho e forma.

A produção de nanopartículas biogênicas em larga escala ainda é desafiadora e pode limitar a disponibilidade para uso clínico; por isso a necessidade da utilização de modelos sustentáveis e econômicos, como os fungos.

As AgNPs biogênicas podem interagir com diferentes componentes biológicos, incluindo proteínas, lipídios e DNA, e provocar efeitos indesejados no organismo. Portanto estudos devem ser conduzidos para avaliar a biodisponibilidade e a farmacocinética das AgNPs, bem como sua interação com outras terapias, antes de seu uso clínico em humanos. Estudos estão em andamento, porém os dados ainda são incipientes para garantirem o uso terapêutico de forma segura.

A segurança quanto à toxicidade para o hospedeiro é uma das características mais relevantes para um candidato a fármaco, conforme evidenciado em diversos estudos (SANFELICE et al., 2021). Nesse contexto, o estudo da atividade e mecanismo de ação das AgNPs são cruciais.

Nesse estudo foi constatado que a concentração efetiva das AgNPs para células tumorais não resultou em toxicidade significativa para os fibroblastos humanos normais. Além disso, os resultados evidenciaram, que dentre as diferentes AgNPs testadas, a AgNP-AT apresenta melhores IS em baixa concentração, especialmente em células TNBC MDA-MB-231, que possuem grande importância médica. Devido a essa característica promissora, a investigação da ação citotóxica da AgNP-AT nas células TNBC MDA-MB-231 é encorajada.

Em vista da alta citotoxicidade e seletividade das AgNP-AT pelas células TNBC MDA-MB-231, as fases do ciclo celular foram avaliadas após exposição a essas nanopartículas, dado a importância desse processo complexo que envolve diferentes proteínas importantes para regulação de eventos específicos e multiplicação celular (SCHAFER, 1998).

A análise foi conclusiva em mostrar alterações nas fases do ciclo celular das células normais e tumorais, com parada na fase S. Os resultados determinam que a alteração da porcentagem populacional em 24 h, para fibroblastos normais, foi recuperada ao longo do tempo analisado. Um resultado diferente foi encontrado anteriormente por nosso grupo (OTTONI et al., 2019), no qual até 1 μM não houve alteração significativa na distribuição celular entre as diferentes fases do ciclo em células humanas normais do endotélio de veias do cordão umbilical (HUVEC) e fibroblastos (FN1). Essa diferença pode estar relacionada a concentração de AgNPs que no presente estudo é 15, 30 e 60x superior ao estudo anterior. Essa constatação concorda o estudo realizado por Liu et al. (2021) os quais observaram que o efeito citotóxico das AgNPs em células normais ocorre de maneira dose-dependente.

No presente trabalho observou-se um aumento da população de células MDA-MB-231 na fase S em todas as concentrações de AgNP-AT e tempos analisados, enquanto ocorreu uma diminuição na população G0/G1 em comparação com o grupo controle não tratado, principalmente em 72 h.

As células MDA-MB-231 tratadas com o antitumoral cisplatina apresentaram diminuição na fase G0/G1 e aumento na fase S de maneira similar ao observado para as AgNP-AT. A relação de aumento na fase de síntese do DNA e diminuição da fase G0/G1 foi anteriormente relatado por Hatzidaki et al. (2020) que observaram o mesmo fenômeno para células MDA-MB-231 e MCF-7, após tratamento com 0,1 μM e 1 μM de cisplatina. No presente estudo, a cisplatina foi avaliada a 38, 76 e 152 μM , sendo concentrações bem superiores e o efeito citotóxico se manteve.

Nas células FN1, a cisplatina reduziu a porcentagem de células em G0/G1, porém não estatisticamente significativa, e este efeito foi compensado pelo aumento das células na fase G2M.

A parada na fase S do ciclo das células tumorais já é bem relatada na literatura. Chairuankitti et al. (2013) observaram a diminuição do número de células na fase G1 e a parada do ciclo celular na fase S para células A549 (carcinoma pulmonar) quando tratadas com AgNPs sintéticas, esféricas e com tamanho de $182,7 \pm 13,0$ nm, a 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$. Esse resultado, evidencia um efeito antiproliferativo via parada do ciclo celular, independente da geração de ROS. Em concordância, Panzarini et al. (2017) constataram parada na fase S e G2M com aumento na fase SubG1 em células HeLa (carcinoma epitelioide do colo do útero humano) após ação das AgNPs sintéticas (30 ± 5 nm) com concentração de 1,35 $\mu\text{g/mL}$. Em outro estudo, AgNPs biossintetizadas usando extratos de *Annona glabra* e *Annona squamosa*, com tamanhos médios em torno de 7 nm também provocaram parada na fase S do ciclo celular em células

adenocarcinoma de próstata metastático (PC3), adenocarcinoma de ovário (SKOV3) e células HeLa (MOKHTAR et al., 2022).

A fase S do ciclo celular envolve a replicação do DNA. Quando as células são expostas às AgNPs, podem ocorrer respostas ao estresse, incluindo ativação de checkpoints mitocondriais, como o ponto de controle G2M e o ponto de controle na fase S. Além disso, danos no DNA, causados pelas AgNPs, como quebras de cadeias e ligações cruzadas, também acionam checkpoints intracelulares, como a via ATM/ATR, interrompendo o ciclo celular para reparos. As mitocôndrias desempenham um papel essencial na produção de ATP, e na liberação de moléculas pró-apoptóticas, como o citocromo C. Danos causados pelas AgNPs podem comprometer a integridade das mitocôndrias levando à liberação de moléculas pró-apoptóticas. Esse conjunto de eventos - danos ao DNA, parada na fase S e integridade mitocondrial comprometida - ativa cascatas apoptóticas, resultando na morte das células tumorais (HORBAY; BILYY, 2016; HOLMILA et al., 2019). A realização do ensaio de proliferação celular auxilia a compreender os mecanismos de ação das AgNPs nas células em estudo, e permite a identificação das concentrações mais ativas em determinadas situações experimentais, fornecendo subsídios para a investigação *in vivo* (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016). A alteração da fase de crescimento e desenvolvimento celular (G0/G1) acarreta a diminuição do número de células viáveis para progredir ao estágio de mitose (G2/M) impedindo a proliferação celular; essas características são essencialmente investigadas para a prospecção de novos fármacos antitumorais (NOZHAT et al., 2022).

Os dados do ensaio de proliferação celular evidenciaram um aumento na proliferação das células FN1 quando expostas a AgNP-AT a 0,015 e 0,03 mM. Essa constatação valida os resultados obtidos no ensaio de ciclo celular que mostrou haver alterações nas fases de multiplicação celular (G0/G1) e síntese do DNA (S). A recuperação da proliferação de fibroblastos normais tratados com AgNPs já é relatada na literatura (ASHARANI; HANDE; VALIYAVEETTIL, 2009).

Na análise de ciclo celular foi constatado um aumento no número de células tumorais na fase G0/G1 quando tratadas com AgNPs a 0,06 mM, e uma diminuição nesta mesma fase quando expostas a menor concentração de 0,015 mM. Similarmente, o ensaio de proliferação celular mostrou haver diminuição do número celular quando as AgNP-AT são administradas em menor concentração. O grupo tratado com AgNP-AT a 0,06 mM teve aumento da proliferação celular de 11,7%, enquanto a proliferação das células tumorais foi de 9,6% na concentração de 0,015 mM. Esses dados são consistentes com a análise realizada por Nowrouzi et al. (2010), que demonstrou que AgNPs em concentração abaixo do IC50 para células HepG2 (hepatoma humano) foi suficientemente eficaz na diminuição da proliferação celular.

O antitumoral cisplatina usado como controle, não alterou significativamente a proliferação das células FN1 e MDA-MB-231, exceto na concentração de 0,038 mM em FN1. Nessa célula houve aumento de 25% na proliferação, assim como mostrado na análise de ciclo celular, na qual o antitumoral causou o aumento da fase de G0/G1 nas células FN1, apenas em 24 h, mostrando a pouca citotoxicidade da cisplatina para células normais.

A toxicidade da cisplatina pode ser influenciada pela dose administrada, duração do tratamento e sensibilidade do tecido-alvo. Em geral, células normais têm uma maior capacidade de reparação do DNA (que é a principal via de ação da cisplatina) e podem ser menos sensíveis aos efeitos citotóxicos da cisplatina em comparação às células cancerosas (HATZIDAKI et al., 2020).

As partículas de prata em tamanho nano podem liberar íons Ag^+ em proporção 100 vezes superior à sua contraparte em tamanho macroscópico (BURRELL, 2003; LANSDOWN, 2010). A liberação persistente de íons Ag^+ combinada com a propriedade citotóxica e a alta seletividade observada nos ensaios de viabilidade celular culminam em uma ação ordenada e contínua contra as células tumorais TNBC MDA-MB-231.

O fenótipo triplo-negativo das células MDA-MB-231 requer tratamentos não somente específicos, mas consistentes e duradouros (BIANCHINI et al., 2021), os quais não seria possível com a utilização de íons de Ag^+ em folha ou outra forma metálica.

Os resultados das análises por Anexina V e IP elucidam que os níveis de células MDA-MB-231 no estágio de apoptose foi aumentado com a utilização de AgNP-AT a 0,03 mM (IC50) em 1,7 vezes, enquanto o antitumoral cisplatina a 0,076 mM (IC50) diminuiu em 46% a taxa de células em apoptose. A cisplatina reduziu o índice de proliferação celular em todas as concentrações testadas, com principal declínio na concentração de IC50 a 0,076 mM, e a parada do ciclo celular na fase de síntese do DNA (fase S) das células tumorais. Esse conjunto de dados confirma que a citotoxicidade da cisplatina é mediada pela inibição do crescimento celular com danos ao DNA, conforme já relatado (DASARI; BERNARD TCHOUNWOU, 2014).

Em fibroblastos normais, as AgNP-AT e a cisplatina provocaram o aumento da taxa de necrose em 1,4 e 4,6 vezes, respectivamente. Além disso, a cisplatina alterou a viabilidade de fibroblastos normais de maneira dose dependente, enquanto a AgNP-AT não alterou significativamente esse índice. Esses dados confirmam a especificidade das AgNP-AT para células TNBC MDA-MB-231. Sendo assim, confirmamos mais uma vez com ensaio de apoptose e necrose que as AgNPs são fortes candidatas a fármacos antitumorais com especificidade direcional as células com fenótipo TNBC.

Conforme relatado por Kumar et al. (2015) a citotoxicidade em fibroblastos normais é dependente do tamanho, dose e tempo de exposição às AgNPs, portanto as características intrínsecas das AgNP-AT testadas nesse projeto foram essenciais para sua especificidade.

Snyder et al. (2021) demonstraram que a indução de apoptose celular não é influenciada diretamente pela concentração de Ag^+ no meio intracelular, mas por uma sequência de eventos prejudiciais a homeostase que culminam na morte celular. Outro estudo, relata que apesar da alta taxa de morte celular por apoptose ou necrose, uma via comum de citotoxicidade das AgNPs é por inibição de fases específicas do ciclo celular e inibição da proliferação (CHAIRUANGKITTI et al., 2013) corroborando os resultados desse estudo.

O mecanismo de sensibilização das células TNBC MDA-MB-231 às AgNPs ainda não está totalmente esclarecido, entretanto, pode ser parcialmente inferido relacionando os dados obtidos pelos diferentes ensaios e considerando as características físico-químicas das AgNP-AT biossintetizadas. Desse modo, cabe destacar a comparação entre os dados obtidos pelo ensaio de Anexina V e IP, e o observado no ensaio de proliferação celular, o qual demonstrou a inibição da proliferação de células tumorais MDA-MB-231 em uma taxa significativa de 88,2%. Essa constatação indica que a ação das AgNP-AT se dá principalmente por vias antiproliferativas.

A mutagenicidade consiste na capacidade de um agente químico ou físico causar mutações no material genético de um organismo vivo, o que pode levar a alterações hereditárias ou até mesmo ao desenvolvimento de câncer (BRIDGES, 1984). Estudos genotóxicos *in vitro* e *in vivo* são encorajados para discutir os mecanismos de mutagenicidade induzida por nanopartículas e seus efeitos adversos. Tais avaliações devem ser realizadas em diferentes modelos celulares e animais, uma vez que a resposta pode variar conforme a espécie e tipo celular (RODRIGUEZ-GARRAUS et al., 2020). Nesse contexto, o ensaio de mutagênese cromossômica *in vitro* é importante para elucidar o potencial mutagênico das AgNPs e entender como ocorre a ação intracelular.

Sabe-se que AgNPs não exercem, no geral, efeitos mutagênicos em células procarióticas (WU et al., 2022), mas pouco se sabe sobre o potencial mutagênico em células eucarióticas. Há relatos de interferência das AgNPs em proteínas como a tubulina e consequente interrupção na síntese de microtúbulos (NIRMALA; MEHER; LOPUS, 2022), morte celular por geração de ROS e danos a estrutura do DNA (OTARI et al., 2015), liberação de íons de prata (Ag^+) intracelular (ISHIDA, 2017) e destruição da estrutura da membrana (XIAO; CHEN; ALNAGGAR, 2019). Recentemente, foi relatado a mutagenicidade de AgNPs em genomas eucarióticos em detalhes, sendo constatado a ameaça de genotoxicidade para as células humanas, porém em baixa magnitude (WU et al., 2023) o que evidencia o potencial de aplicação farmacológica das AgNPs e encoraja a continuação dos estudos em modelos vivos.

As diferenças estruturais, químicas, de tamanho e forma, bem como à sua capacidade de se ligar a proteínas e interferir nas vias de sinalização celular podem interferir no potencial

mutagênico das AgNPs (LI et al., 2017). Adicionalmente, a mutagenicidade das AgNPs pode ser influenciada pela presença de outros agentes químicos, como antioxidantes e agentes quelantes. Portanto, a utilização de protocolos padronizados, como os estabelecidos pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), é fundamental para garantir a qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos.

No presente estudo, a análise das imagens capturadas durante o ensaio de mutagenicidade mostrou a presença de nanopartículas ao redor da membrana celular e no meio intracelular, mas nenhum dano a estrutura das células foi constatado para AgNP-AT a 0,03 mM (IC50). Esses resultados corroboram com o anteriormente encontrado por Padilla-Camberos et al. (2022), os quais demonstraram que as AgNPs biossintetizadas a partir do extrato da casca de *Stenocereus queretaroensis* tiveram baixa toxicidade em células A549, com uma concentração letal (CL50) de 29,3 µg/mL. Além disso, não foram observados efeitos tóxicos significativos em camundongos após exposição oral ou intraperitoneal às AgNPs, indicando baixa toxicidade sistêmica. Em um estudo detalhado sobre a genotoxicidade das AgNPs sintéticas, Sik Kim et al. (2013) também constataram a ausência de efeito tóxico relevante em micro-organismos, linhagens de células de mamíferos ou órgãos de animais-alvo, e destacaram que a genotoxicidade relaciona-se não somente com as concentrações utilizadas, mas também com o tempo de exposição aos agentes químicos.

Assim sendo, o uso de AgNPs, sobretudo as biogênicas, pode se configurar como uma opção viável e ecologicamente sustentável para aplicações farmacêuticas e terapêuticas. No entanto, a investigação acerca da mutagenicidade dessas nanopartículas ainda é uma área em progresso, sendo imprescindível seguir pesquisando seu impacto em variados sistemas biológicos e as consequências em longo prazo.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo evidencia que:

- 1- As sete AgNPs biogênicas diminuíram significativamente a viabilidade das células tumorais analisadas e mostraram baixa toxicidade para fibroblastos humanos normais.
- 2- As AgNPs foram menos citotóxicas que o antitumoral cisplatina para fibroblastos normais.
- 3- A AgNP-BO apresentou índice de seletividade de 61,38 e a AgNP-Asp de 52,13 indicando a especificidade de ambas as nanopartículas pelas células tumorais.
- 4- A AgNP-AT obtida utilizando o fungo *A. tubingensis* foi a mais citotóxica para as células tumorais TNBC MDA-MB-231, com índice de seletividade de 85,20 em 48 h.
- 5- A presença da camada proteica ao redor do núcleo metálico pode ter favorecido a biocompatibilidade e a especificidade da AgNPs pelas células tumorais.
- 6- A AgNP-AT a 0,015, 0,03 e 0,06 mM causou a interrupção do ciclo celular de MDA-MB-231 na fase S em 24, 48 e 72 h.
- 7- Em fibroblastos, a AgNP-AT a 0,015, 0,03 e 0,06 mM causou a interrupção na fase S do ciclo celular, porém esse efeito não persistiu em até 72 h, indicando irreversibilidade apenas em células tumorais ao longo do tempo analisado.
- 8- As AgNP-AT alteraram os índices de proliferação celular de ambas as células analisadas, se mostrando mais citotóxicas para células tumorais em menores concentrações.
- 9- Em fibroblastos normais, a AgNP-AT apresentou maior citotoxicidade a 0,06 mM, e um aumento significativo da proliferação celular nas menores concentrações, o que também foi observado para a cisplatina.
- 10- As AgNP-AT não causaram danos aos cromossomos das células V79-4 na concentração de IC50 (0,03 mM).
- 11- A 0,03 mM (IC50) as AgNP-AT induziram apoptose das células MDA-MB-231, sem danos significativos aos fibroblastos normais.
- 12- A 0,076 mM (IC50), a cisplatina diminuiu em 46% a taxa das células tumorais em estágio de apoptose e apresentou taxa de necrose elevada em 4,6 vezes para os fibroblastos.
- 13- Além da seletividade das AgNPs pelas células tumorais MDA-MB-231, os dados indicam que essas células são afetadas pela interrupção da síntese de DNA na fase S do ciclo celular, e que as propriedades antiproliferativas das AgNP-AT são mais evidentes do que os efeitos pró-apoptóticos.
- 14- Este estudo oferece novas perspectivas sobre o mecanismo de ação das AgNPs biogênicas em células tumorais e normais humanas. Estudos posteriores devem ser conduzidos para confirmar a ação antitumoral em modelo *in vivo*, assim como a farmacodinâmica e farmacocinética da AgNP-AT.

REFERÊNCIAS

- ABDELLATIF, A. A. H. et al. Green synthesis of silver nanoparticles reduced with *Trigonella foenum-graecum* and their effect on tumor necrosis factor- α in MCF7 cells. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 26, p. 5529–5539, 2022.
- ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, p. 1213–1221, 2016.
- AGHEBATI-MALEKI, A. et al. Nanoparticles and cancer therapy: perspectives for application of nanoparticles in the treatment of cancers. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, p. 1962–1972, 2020.
- ALGOTIML, R. et al. Anticancer and antimicrobial activity of biosynthesized Red Sea marine algal silver nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 12, p. 1–18, 2022.
- ANASTAS P. T; WARNER J. C. Green chemistry: theory and practice. **Oxford University Press**, v.1, p. 135, 1998.
- ARAÚJO, W. L. et al. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 229–236, 2001.
- ARUOJA, V. et al. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 1461–1468, 2009.
- ASHARANI, P. V.; HANDE, M. P.; VALIYAVEETIL, S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. **BMC Cell Biology**, v. 10, p. 65, 2009.
- BALLOTTIN, D. et al. Elucidating protein involvement in the stabilization of the biogenic silver nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, p.313, 2016.
- BARABADI, H. et al. *Penicillium* family as emerging nanofactory for biosynthesis of green nanomaterials: a journey into the world of microorganisms. **Journal of Cluster Science**, v. 30, p. 843–856, 2019.
- BARABADI, H.; KOBARFARD, F.; VAHIDI, H. Biosynthesis and characterization of biogenic tellurium nanoparticles by using *Penicillium chrysogenum* PTCC 5031: a novel approach in gold biotechnology. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR**, v. 17, p. 87, 2018.
- BARZAMAN, K. et al. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. **International Immunopharmacology**, v. 84, p. 1–10, 2020.
- BEELER, E.; SINGH, O. V. Extremophiles as sources of inorganic bio-nanoparticles. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 156, 2016.
- BELLASSAI, N. et al. Surface plasmon resonance for biomarker detection: advances in non-invasive cancer diagnosis. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 570, 2019.
- BERRIEN-ELLIOTT, M. M.; JACOBS, M. T.; FEHNIGER, T. A. Allogeneic natural killer cell therapy. **Blood**, v. 141, p. 856–868, 2023.
- BEST, L. M. J.; MUGHAL, M.; GURUSAMY, K. S. Non-surgical versus surgical treatment for oesophageal cancer. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 3, p. 1–48, 2016.
- BIANCHINI, G. et al. Treatment landscape of triple-negative breast cancer — expanded options, evolving needs. **Nature Reviews Clinical Oncology**, p. 91–113, 2021.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, p. 394–424, 2018.
- BRIDGES, B. A. Use of the terms mutagenicity and genotoxicity. **Mutation Research**, v. 132, p. 139, 1984.
- BURRELL, R. A scientific perspective on the use of topical silver preparations. **Ostomy Wound Management**, v. 49, p.19-24, 2003.

- BURSTEIN, H. J. et al. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor–positive breast cancer: ASCO clinical practice guideline focused update. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, p. 423–438, 2019.
- BUTTACAVOLI, M. et al. Anticancer activity of biogenerated silver nanoparticles: an integrated proteomic investigation. **Oncotarget**, v. 9, p. 9685–9705, 2017.
- CARBONE, A. Cancer classification at the crossroads. **Cancers**, v. 12, p. 980, 2020.
- CERIMI, K. et al. Fungi as source for new bio-based materials: a patent review. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 6, p. 17, 2019.
- CHAIRUANGKITTI, P. et al. Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. **Toxicology in vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA**, v. 27, p. 330–338, 2013.
- CHOW, A.; PERICA, K.; KLEBANOFF, C. A.; WOLCHOK, J. D. Clinical implications of T cell exhaustion for cancer immunotherapy. *Nature Reviews*. **Clinical Oncology**, v. 19, p. 775–790, 2022.
- DASARI, S.; BERNARD TCHOUNWOU, P. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 364–378, 2014.
- DE SOUZA, A. O. Overview of nanomaterials and cellular interactions. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 13, p. 367, 2023.
- DE SOUZA, A.O.; RODRIGUES, A. G. Biosynthesis of silver nanoparticles by fungi. In: **Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments**. V.1, p. 115–135, 2015.
- DHAKAR, K.; PANDEY, A. Wide pH range tolerance in extremophiles: towards understanding an important phenomenon for future biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 2499–2510, 2016.
- DOLGIN, E. Cancer’s new normal. **Nature Cancer**, v. 2, p. 1248–1250, 2021.
- DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, p. 889–905, 1998.
- DUARTE, S. H. et al. Exploration of Brazilian biodiversity and selection of a new oleaginous yeast strain cultivated in raw glycerol. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 377–381, 2013.
- DUFFY, M. J.; MCDERMOTT, E. W.; CROWN, J. Use of multiparameter tests for identifying women with early breast cancer who do not need adjuvant chemotherapy. **Clinical Chemistry**, v. 63, p. 804–806, 2017.
- EL-READI, M. Z.; ALTHUBITI, M. A. Cancer nanomedicine: a new era of successful targeted therapy. **Journal of Nanomaterials**, v. 2019, p.1687-4110, 2019.
- FALLEIROS, J. P. B.; BRANDL, A. L.; FONSECA, A. R. A. DA. Aplicações da nanotecnologia no diagnóstico e tratamento de câncer. **Nucleus**, v. 8, p. 151–169, 2011.
- FAN, M. et al. Ultrasmall gold nanoparticles in cancer diagnosis and therapy. **Theranostics**, v. 10, p. 4944–4957, 2020.
- FÉLIX-PIÑA, P.; FRANCO MOLINA, M. A.; ZARATE TRIVIÑO, D. G.; GARCÍA CORONADO, P. L.; ZAPATA BENAVIDES, P.; RODRÍGUEZ PADILLA, C. Antitumoral and immunogenic capacity of β -d-glucose-reduced silver nanoparticles in breast cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, p. 8485, 2023.
- FERLAY, J. et al. Cancer statistics for the year 2020: an overview. **International Journal of Cancer**, v. 149, p. 778 –789, 2021.
- FUERTES, M. et al. Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 257–266, 2012.
- GADE, A. K. et al. Exploitation of *Aspergillus niger* for synthesis of silver nanoparticles. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 2, p. 243–247, 2008.

- GARRIDO-CASTRO A. C.; LIN, N. U.; POLYAK, K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment. **Cancer Discovery**, v. 9, p. 176, 2019.
- GENG, S.; PRADHAN, K.; LI, L. Signal-strength and history-dependent innate immune memory dynamics in health and disease. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 276, p. 23–41, 2022.
- GIL, P. R.; PARAK, W. J. Composite nanoparticles take aim at cancer. **ACS Nano**, v. 2, p. 2200–2205, 2008.
- GURUNATHAN, S. et al. Cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in MDA-MB-231 human breast cancer cells. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–10, 2013.
- HAN, J. W. et al. Dual functions of silver nanoparticles in F9 teratocarcinoma stem cells, a suitable model for evaluating cytotoxicity- and differentiation-mediated cancer therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 7529–7549, 2017.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, p. 646–674, 2011.
- HATZIDAKI, E. et al. Increased breast cancer cell sensitivity to cisplatin using a novel small molecule inhibitor. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 16, p. 1393–1401, 2020.
- HOLMILA, R. J. et al. Silver Nanoparticles Induce Mitochondrial Protein Oxidation in Lung Cells Impacting Cell Cycle and Proliferation. **Antioxidants**, v. 8, p. 552, 2019.
- HORBAY, R.; BILYY, R. Mitochondrial dynamics during cell cycling. **Apoptosis**, v. 21, p. 1327–1335, 2016.
- HULKOTI, N. I.; TARANATH, T. C. Biosynthesis of nanoparticles using microbes- a review. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 121, p. 474–483, 2014.
- HUSAIN, S. et al. Emerging trends in advanced translational applications of silver nanoparticles: a progressing dawn of nanotechnology. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 14, p. 47, 2023.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2023 Incidência de Câncer no Brasil. **Ministério da Saúde**, 2022.
- ISHIDA, T. Anticancer activities of silver ions in cancer and tumor cells and DNA damages by Ag⁺ - DNA base-pairs reactions. **MedCrave Online Journal of Tumor Research**, v. 1, p.8–16, 2017.
- JACKSON, T. C.; PATANI, B. O.; ISRAEL, M. B. Nanomaterials and cell interactions: a review. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 08, p. 220–228, 2017.
- JAIN, K. K. Progress in Molecular Biology and Translational Science. Chapter 8- Nanobiotechnology and Personalized Medicine. **Academic Press**, v. 104, p. 325–354, 2011.
- JUIBARI, M. M. et al. Investigation of a hot-spring extremophilic *Ureibacillus thermosphaericus* strain thermo-BF for extracellular biosynthesis of functionalized gold nanoparticles. **BioNanoScience**, v. 5, p. 233–241, 2015.
- KABAKOV, A. E.; GABAI, V. L. Cell death and survival assays. **Methods in Molecular Biology**, v. 1709, p. 107–127, 2018.
- KATHIRESAN, K. et al. Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 71, p. 133–137, 2009.
- KHALIL, A. T. et al. Microbes-mediated synthesis strategies of metal nanoparticles and their potential role in cancer therapeutics. **Seminars in Cancer Biology**, v. 86, p. 693–705, 2022.
- KIM, T. H. et al. Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 100 A, p. 1033–1043, 2012.
- KITIMU, S. R. et al. Anti-angiogenic and anti-metastatic effects of biogenic silver nanoparticles synthesized using *Azadirachta indica*. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 13, p. 188–206, 2022.

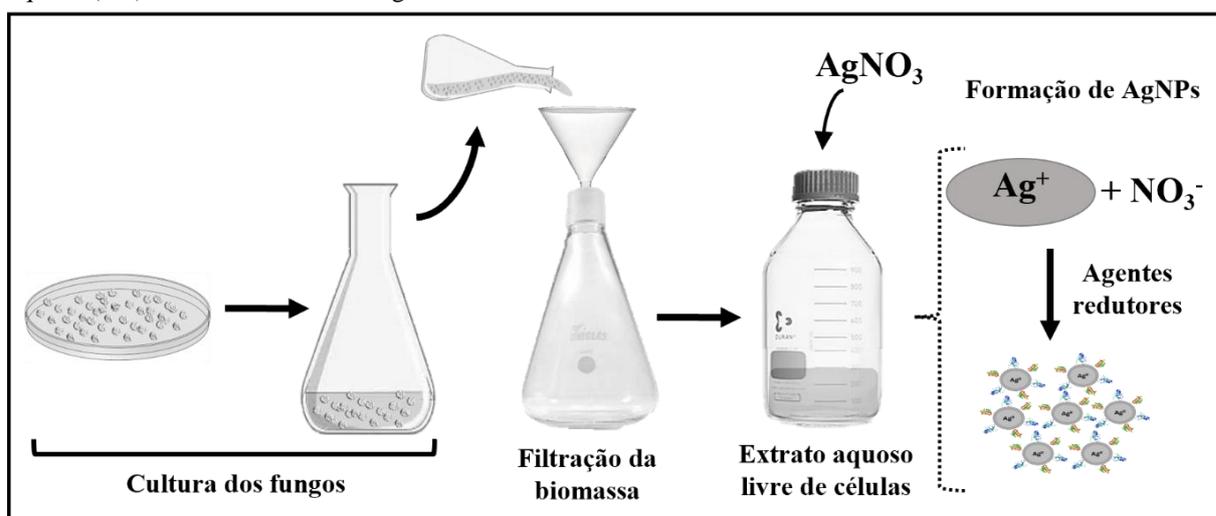
- KUMAR, G. et al. Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles. **Food and Chemical Toxicology**, v. 85, p. 45–51, 2015.
- LANSDOWN, A. B. G. A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2010, p.1–16, 2010.
- LATTIME, E. C.; GERSON, S. L. Gene therapy of cancer: translational approaches from preclinical studies to clinical implementation, 3rd edition. **Gene Therapy of Cancer: Translational Approaches from Preclinical Studies to Clinical Implementation**, v.3, p. 1–537, 2013.
- LAU, K. H. et al. New and emerging targeted therapies for advanced breast cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, p. 2288, 2022.
- LEEBEEK, F. W. G.; MIESBACH, W. Gene therapy for hemophilia: a review on clinical benefit, limitations, and remaining issues. **Blood**, v. 138, p. 923–931, 2021.
- LEHMANN, B. D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, p. 2750, 2011.
- LEITE, F. L. et al. Theoretical models for surface forces and adhesion and their measurement using atomic force microscopy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 12773–12856, 2012.
- LI Y. J. et al. Artificial exosomes for translational nanomedicine. **Journal Nanobiotechnology**, v. 19, p. 242, 2021.
- LI, Y. et al. Differential genotoxicity mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. **Archives of Toxicology**, v. 91, p. 509–519, 2017.
- LI, Y. F. et al. Systemic anticancer therapy in gynecological cancer patients with renal dysfunction. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 17, p. 739–763, 2007.
- LI, Z. et al. Burden of cancer pain in developing countries: a narrative literature review. **Clinico Economics and Outcomes Research: CEOR**, v. 10, p. 675, 2018.
- LIU, X. et al. Nanotoxic effects of silver nanoparticles on normal hek-293 cells in comparison to cancerous Hela cell line. **International Journal of Nanomedicine**, v. 16, p. 753, 2021.
- MANJUNATH, M.; CHOUDHARY, B. Triple-negative breast cancer: a run-through of features, classification and current therapies. **Oncology Letters**, v. 22, p. 512, 2021.
- MANSOOR, S. et al. Fabrication of silver nanoparticles against fungal pathogens. **Frontiers in Nanotechnology**, v. 3, p. 67, 2021.
- MARTÍNEZ-GUTIERREZ, F. et al. Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, p. 328–336, 2012.
- MATTIUZZI, C.; LIPPI, G. Current cancer epidemiology. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 9, p. 217–222, 2019.
- MATYSIAK-KUCHAREK, M. et al. Two sides to the same coin—cytotoxicity vs. potential metastatic activity of AgNPs relative to triple-negative human breast cancer MDA-MB-436 cells. **Molecules**, v. 25, p. 2375, 2020.
- MOKHTAR, F. A. et al. Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Annona glabra* and *Annona squamosa* extracts with antimicrobial, anticancer, apoptosis potentials, assisted by in silico modeling, and metabolic profiling. **Pharmaceuticals**, v. 15, p. 1354, 2022.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.
- MURRAY, A. Cell cycle checkpoints. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 6, p. 872–876, 1994.
- NAGINI, S. Breast cancer: current molecular therapeutic targets and new players. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 152–163, 2017.
- NAJAH-MISSAOUI, W.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. Safe nanoparticles: are we there yet? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 1–22, 2021.

- NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 156, p. 1–13, 2010.
- NIRMALA, J. G.; MEHER, K.; LOPUS, M. Proteomic and metabolomic profiling combined with *in vitro* studies reveal the antiproliferative mechanism of silver nanoparticles in MDA-MB-231 breast carcinoma cells. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 10, p. 2148–2159, 2022.
- NOWROUZI, A. et al. Cytotoxicity of subtoxic AgNP in human hepatoma cell line (HepG2) after long-term exposure. **Iranian Biomedical Journal**, v. 14, p. 23, 2010.
- NOZHAT, Z. et al. Different methods for cell viability and proliferation assay: essential tools in pharmaceutical studies. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 703–712, 2022.
- ORTEGA, F. G. et al. Study of antitumor activity in breast cell lines using silver nanoparticles produced by yeast. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 2021–2031, 2015.
- OTARI, S. V. et al. Intracellular synthesis of silver nanoparticle by actinobacteria and its antimicrobial activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 136, p. 1175–1180, 2015.
- OTTONI, C. A. et al. Biogenic: *Aspergillus tubingensis* silver nanoparticles' *in vitro* effects on human umbilical vein endothelial cells, normal human fibroblasts, HEPG2, and *Galleria mellonella*. **Toxicology Research**, v. 8, p. 789–801, 2019.
- OTTONI, C. A. et al. Environmental impact of biogenic silver nanoparticles in soil and aquatic organisms. **Chemosphere**, v. 239, p. 1–8, 2020.
- OTTONI, C. A. et al. Glycerol and ethanol oxidation in alkaline medium using PtCu/C electrocatalysts. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 13, p. 1893–1904, 2018.
- PADILLA-CAMBEROS, E. et al. Toxicological evaluation of silver nanoparticles synthesized with peel extract of *Stenocereus queretaroensis*. **Materials**, v. 15, p.1–15, 2022.
- PANZARINI, E. et al. Glucose capped silver nanoparticles induce cell cycle arrest in HeLa cells. **Toxicology in vitro**, v. 41, p. 64–74, 2017.
- PAQUET, P.; GERALD P. Toxic epidermal necrolysis: revisiting the tentative link between early apoptosis and late necrosis (review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 19, p. 3–10, 2007.
- PARK, W.; CHAWLA, A.; O'REILLY, E. M. Pancreatic cancer: a review. **American Medical Association**, v. 326, p. 851, 2021.
- PICCINNO, F. et al. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, p. 1109, 2012.
- RAI, M. et al. Biogenic silver nanoparticles: what we know and what do we need to know? **Nanomaterials**, v. 11, p. 2901, 2021.
- RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 76–83, 2009.
- RIAZ, M. et al. Exceptional antibacterial and cytotoxic potency of monodisperse greener AgNPs prepared under optimized pH and temperature. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021.
- RIBEIRO, L. G. et al. Antifungal activity of mycogenic silver nanoparticles on clinical yeasts and phytopathogens. **Antibiotics**, v. 12, p. 91, 2023.
- RIBEIRO, L. G. et al. Study of routine metabolism and acute toxicity of mycogenic silver nanoparticles on *Palaemon pandaliformis* (shrimp). **Environmental Science: Nano**, v. 1, p. 1-12, 2023.
- RODRIGUES, A. G. et al. Anti-biofilm action of biological silver nanoparticles produced by *aspergillus tubingensis* and antimicrobial activity of fabrics carrying it. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, p. 14764–14774, 2021.
- RODRIGUES, A. G. et al. Biogenic antimicrobial silver nanoparticles produced by fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 775–782, 2013.

- RODRIGUES, A. G. et al. Functional textiles impregnated with biogenic silver nanoparticles from *Bionectria ochroleuca* and its antimicrobial activity. **Biomedical Microdevices**, v. 21, p. 1–10, 2019.
- RODRIGUEZ-GARRAUS, A. et al. Genotoxicity of silver nanoparticles. **Nanomaterials**, v. 10, p. 251, 2020.
- RODRÍGUEZ-RAZÓN, C. M. et al. Adhesion, proliferation, and apoptosis in different molecular portraits of breast cancer treated with silver nanoparticles and its pathway-network analysis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 1081–1095, 2018.
- SANFELICE, R. A. DA S. et al. Biogenic silver nanoparticles (AgNp-Bio) reduce *Toxoplasma gondii* infection and proliferation in HeLa cells, and induce autophagy and death of tachyzoites by apoptosis-like mechanism. **Acta Tropica**, v. 222, p.1–14, 2021.
- SANTHOSHKUMAR, M. et al. Potential use of bio functionalized nanoparticles to attenuate triple negative breast cancer (MDA-MB-231 cells). **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 46, p. 803–811, 2023.
- SANTOS, F. F. DOS. A encruzilhada da nanotecnologia: inovação, tecnologia e riscos. **Revista de Administração Contemporânea**, v. 14, p. 983–985, 2010.
- SCHAFER, K. A. The cell cycle: a review. **Veterinary Pathology**, v. 35, p. 461–478, 1998.
- SCHLINKERT, P. et al. The oxidative potential of differently charged silver and gold nanoparticles on three human lung epithelial cell types. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 13, p. 1–18, 2015.
- SHAH, A. et al. Biogenic nanoparticles: synthesis, mechanism, characterization and applications. **Biogenic Nanoparticles for Cancer Theranostics**, v. 11, p. 1–18, 2021.
- SHALIGRAM, N. S. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract from the compactin producing fungal strain. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 939–943, 2009.
- SIK KIM, J. et al. Genotoxicity, acute oral and dermal toxicity, eye and dermal irritation and corrosion and skin sensitisation evaluation of silver nanoparticles. **Nanotoxicology**, v. 7, p. 953–960, 2013.
- SINGH, B. N. et al. Bactericidal, quorum quenching and anti-biofilm nanofactories: a new niche for nanotechnologists. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, p. 525–540, 2017.
- SNYDER, C. M. et al. Low doses of silver nanoparticles selectively induce lipid peroxidation and proteotoxic stress in mesenchymal subtypes of triple-negative breast cancer. **Cancers**, v. 13, p. 1–19, 2021.
- SONI, N.; PRAKASH, S.-A. J. Factors affecting the geometry of silver nanoparticles synthesis in *Chrysosporium tropicum* and *Fusarium oxysporum*. **American Journal of Nanotechnology**, v. 2, p. 112–121, 2011.
- SONKER, A. S. et al. Characterization and *in vitro* antitumor, antibacterial and antifungal activities of green synthesized silver nanoparticles using cell extract of *Nostoc* sp. strain HKAR-2. **Canadian Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 26–37, 2017.
- SPRING, B. Q. et al. The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 14, p. 1476–1491, 2015.
- SRIRAM, M. I. et al. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton’s lymphoma ascites tumor model. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 753–762, 2010.
- STERNER, R. C.; STERNER, R. M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. **Blood Cancer Journal**, v. 11, p. 69, 2021.
- STRINGER-REASOR, E. M. et al. Disparities in breast cancer associated with african american identity. American Society of Clinical Oncology Educational Book, v. 41, p. e29–e46, 2021.
- SUBBAIYA, R. et al. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles from *Streptomyces atrovirens* and their potential anticancer activity against human breast cancer cells. **IET Nanobiotechnology**, v. 11, p. 965–972, 2017.

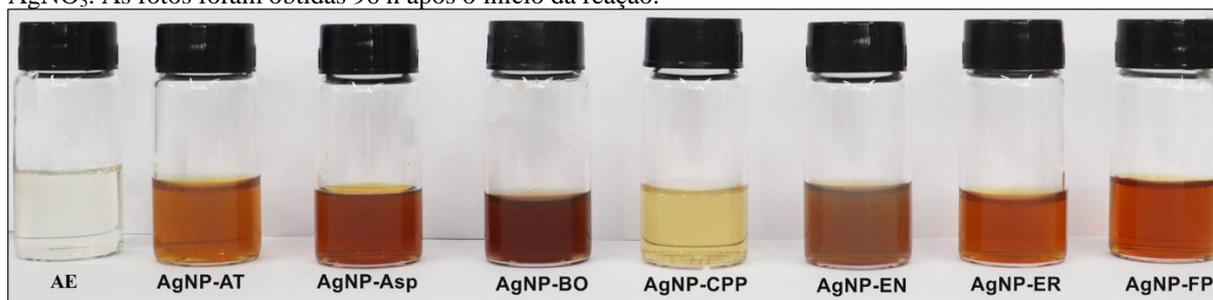
- SUBRAMANIAN, M.; ALIKUNHI, N. M.; KANDASAMY, K. Synthesis of silver nanoparticles by marine yeasts from coastal mangrove sediment. **Advanced Science Letters**, v. 3, p. 428–433, 2010.
- SUNG, H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, p. 209–249, 2021.
- SWANNER, J. et al. Silver nanoparticles selectively treat triple-negative breast cancer cells without affecting non-malignant breast epithelial cells *in vitro* and *in vivo*. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 1, p. 639–660, 2019.
- TABATA, Y.; IKADA, Y. Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of L-lactic acid/glycolic acid homo- and copolymers. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 22, p. 837–858, 1988.
- TAPAK, L. et al. Identification of prognostic biomarkers for breast cancer metastasis using penalized additive hazards regression model. **Cancer Informatics**, v. 22, p. 1–8, 2023.
- TOPORCOV, T. N.; WÜNSCH FILHO, V. Epidemiological science and cancer control. **Clinics**, v. 73, p. 1–11, 2018.
- WARGO, J. A. et al. Immune effects of chemotherapy, radiation, and targeted therapy and opportunities for combination with immunotherapy. **Seminars in Oncology**, v. 42, p. 601–616, 2015.
- WHO. World Cancer Day: Breast cancer overtakes lung cancer in terms of number of new cancer cases worldwide. IARC showcases key research projects to address breast cancer. **IARC**, 2021. Disponível em: <<https://www.iarc.who.int/news-events/world-cancer-day-2021/>>.
- WHO. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. **IARC**, v. 199 n.p. 2020.
- WU, K. et al. Mutagenesis and resistance development of bacteria challenged by silver nanoparticles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, p. 1–18, 2022.
- WU, K. et al. Silver nanoparticles elevate mutagenesis of eukaryotic genomes. **G3: Genes Genomes Genetics**, v. 13, p. 8, 2023.
- XIA, L. et al. The cancer metabolic reprogramming and immune response. **Molecular Cancer**, v. 20, 2021.
- XIAO, H.; CHEN, Y.; ALNAGGAR, M. Silver nanoparticles induce cell death of colon cancer cells through impairing cytoskeleton and membrane nanostructure. **Micron**, v. 126, p. 1–7, 2019.
- XIAO, Y.; YU, D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 221, p. 1–30, 2021.
- XU, L. et al. Silver nanoparticles: synthesis, medical applications and biosafety. **Theranostics**, v. 10, p. 8996–9031, 2020.
- YU, Y. et al. Novel insight into metabolic reprogramming in cancer radioresistance: a promising therapeutic target in radiotherapy. **International Journal of Biological Sciences**, v. 19, p. 811–828, 2023.
- ZHANG, X. et al. Novel natural products from extremophilic fungi. **Marine Drugs**, v. 16, p. 194, 2018.
- ZHANG, X. F. et al. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1–34, 2016.
- ZHU, M. et al. Nanobiotechnology-mediated radioimmunotherapy treatment for triple-negative breast cancer. **MedComm – Biomaterials and Applications**, v. 2, p. 1–18, 2023.
- ZIOTTI, A. B. S. et al. Differential physiological responses of a biogenic silver nanoparticle and its production matrix silver nitrate in *Sorghum bicolor*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 32669–32682, 2021.

ANEXO A – Representação do processo de biossíntese das AgNPs pela reação de óxido redução do extrato aquoso (EA) livre de células com AgNO_3 .



Fonte: Ribeiro et al. (2023).

ANEXO B – Mudança de cor da mistura reacional das AgNP-AT, AgNP-Asp, AgNP-BO, AgNP-CPP, AgNP-EN, AgNP-ER e AgNP-FP formadas pela reação do extrato aquoso (EA) obtido da cultura dos fungos *A. tubingensis*, *Aspergillus* spp., *B. ochroleuca*, *C. pini-ponderosae*, *E. nigrum*, *E. rostratum* e *F. proliferatum* com AgNO_3 . As fotos foram obtidas 96 h após o início da reação.



Fonte: Ribeiro et al. (2023).

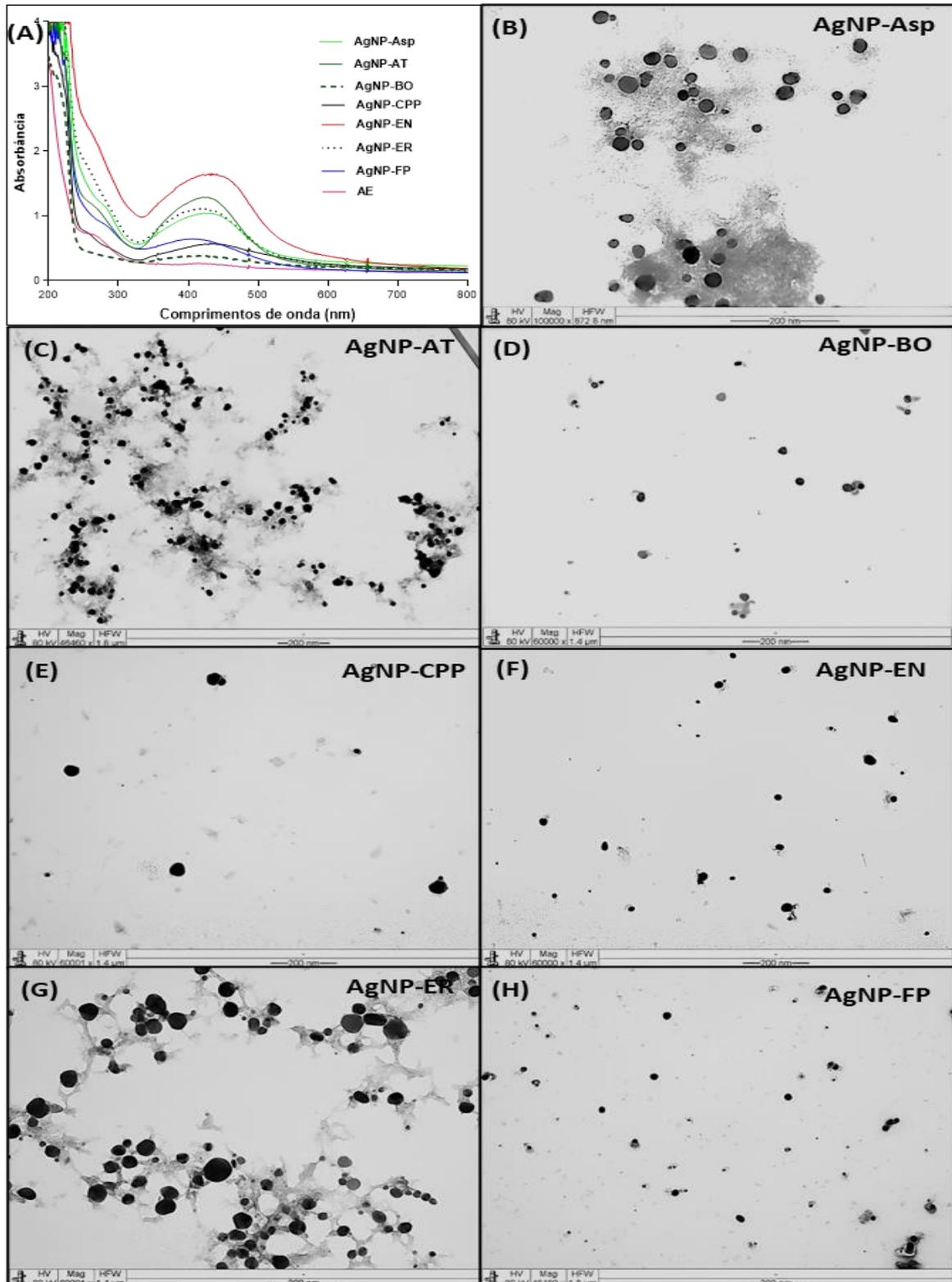
ANEXO C – Propriedades físico-químicas das AgNP-Asp, AgNP-AT, AgNP-BO, AgNP-CCP, AgNP-EN, AgNP-ER e AgNP-FP.

AgNPs	Tamanho (DLS) *	Tamanho (MET) *	PDI	PZ	pH
AgNP-Asp	44,9 ± 4,1	33,3 ± 2,7	0,343	-1,04	6,0
AgNP-AT	43,4 ± 3,3	25,0 ± 6,5	0,080	-22,26	7,0
AgNP-BO	120,6 ± 3,5	21,8 ± 4,1	0,257	-2,19	7,5
AgNP-CPP	87,1 ± 3,4	35,8 ± 5,16	0,334	-1,59	5,0
AgNP-EN	71,2 ± 6,7	28,0 ± 6,31	0,404	-33,28	5,0
AgNP-ER	86,4 ± 6,4	22,1 ± 2,9	0,230	-14,40	4,5
AgNP-FP	59,6 ± 2,1	26,7 ± 5,3	0,199	-15,33	6,0

Fonte: Ribeiro et al. (2023).

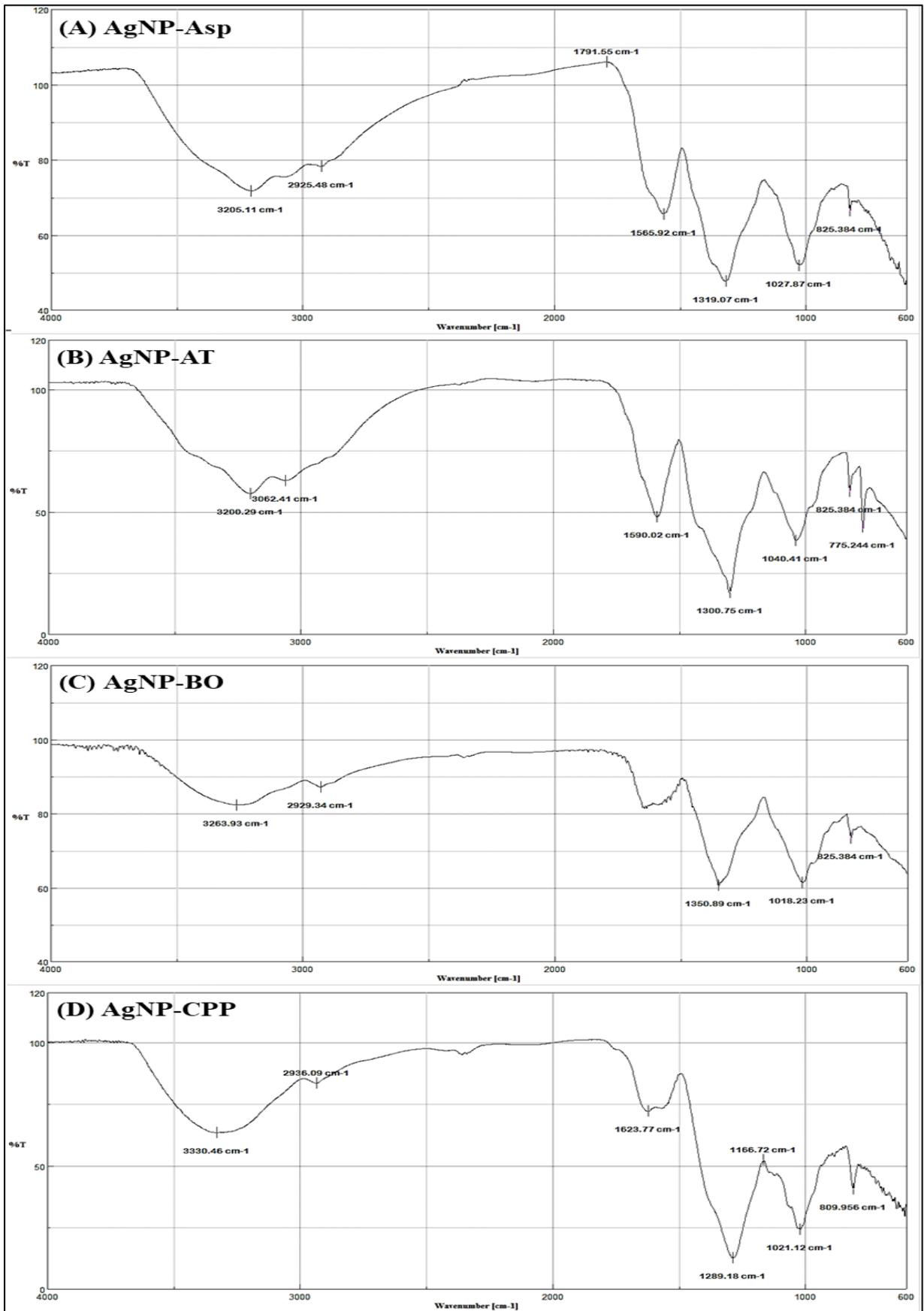
Legenda: DLS - dynamic light scattering, MET - microscopia eletrônica de transmissão, PDI - índice de polidispersão, PZ - potencial Zeta, pH - potencial hidrogeniônico. *Média ± desvio padrão (n = 6).

ANEXO D – Caracterização de AgNPs por (A) perfil UV-Vis de 200 a 800 nm com presença de ressonância plasmônica de superfície em torno de 420 nm para AgNP-Asp, AgNP-AT, AgNP-BO, AgNP-CCP, AgNP-EN, AgNP-ER, e AgNP-FP, obtido a partir do extrato aquoso (AE) livre de células extracelulares da cultura de *Aspergillus* spp., *A. tubingensis*, *B. ochroleuca*, *C. pini-ponderosae*, *E. nigrum*, *E. rostratum* e *F. proliferatum*, respectivamente. Microscopia eletrônica de transmissão para (B) AgNP-Asp (ampliação 100.000×), (C) AgNP-AT (ampliação 46.640×), (D) AgNP-BO (ampliação 60.000×), (E) AgNP-CPP (ampliação 60.001×), (F) AgNP-EN (ampliação 50.000×), (G) AgNP-ER (ampliação 60.001×) e (H) AgNP-FP (ampliação 46.640×). Os extratos aquosos (AE) livres de células extracelulares obtidos de todas as culturas de fungos foram usados como controle para a análise UV-Vis e apresentaram o mesmo perfil.



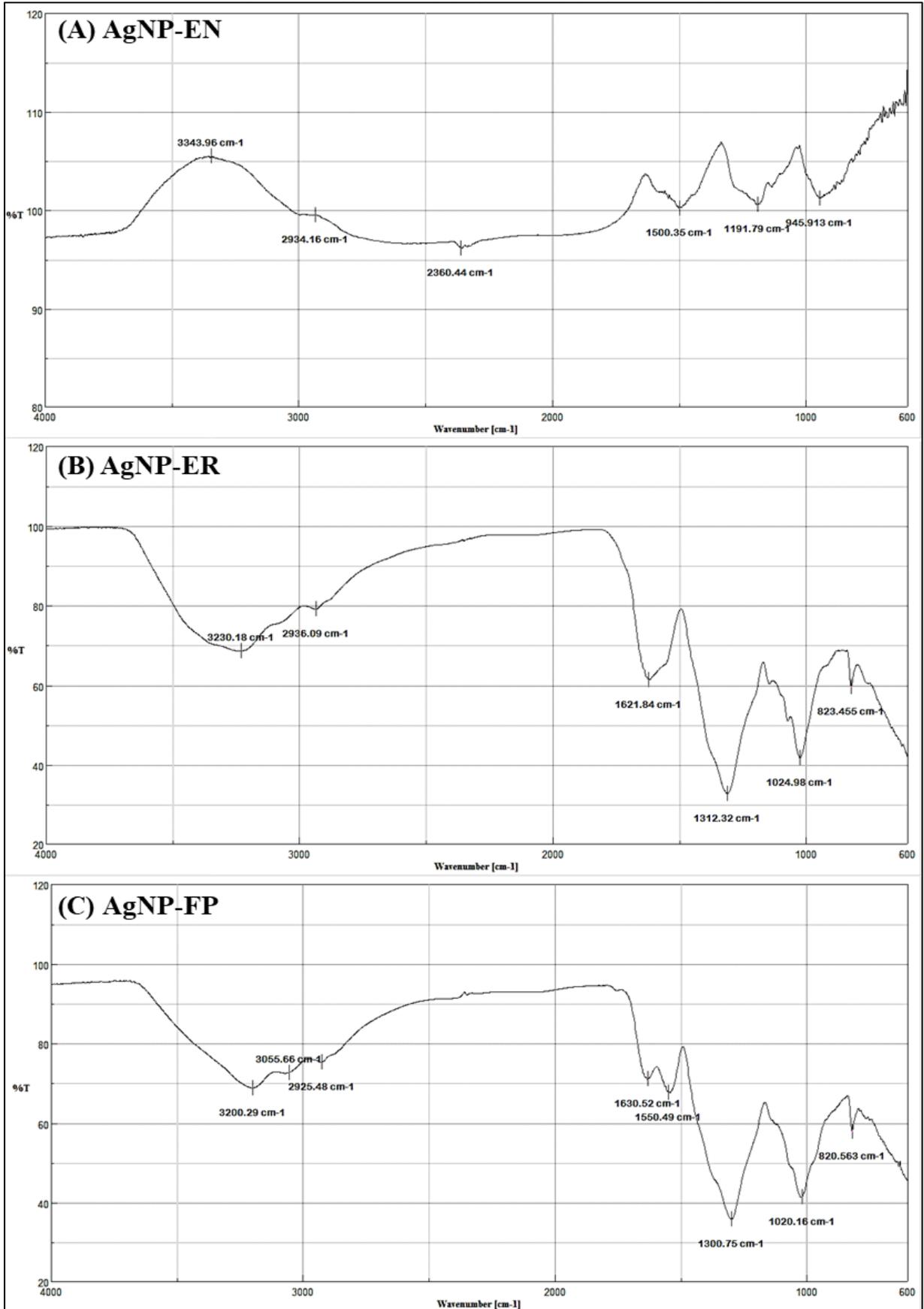
Fonte: Ribeiro et al. (2023).

ANEXO E – Perfil de FTIR para as nanopartículas (A) AgNP-Asp, (B) AgNP-AT (C), AgNP-BO e (D) AgNP-CPP.



Fonte: Ribeiro et al. (2023).

ANEXO F – Perfil de FTIR para as nanopartículas (A) AgNP-EN, (B), AgNP-ER e (C) AgNP-FP.



Fonte: Ribeiro et al. (2023).

ANEXO G – Perfil das frequências vibracionais (cm^{-1}) e grupos funcionais presentes no AgNP-Asp, AgNP-AT, AgNP-BO, AgNP-CPP, AgNP-EN, AgNP-ER e AgNP-FP. Dados obtidos por FTIR.

AgNPs	≈Frequências vibracionais (cm^{-1})	Grupos funcionais	
AgNP-Asp	825–860	Anel aromático (2 H adjacentes)	
	1020–1170	CO (éter)	
	1320	NC (aromático)	
	1560–1490	NH	
	1790	C=O de cloreto de acila	
	2925	Alifático CH	
	3200	OH (quelato)	
	AgNP-AT	840–775	$R_2 C=CHR$ (CH fora do plano)
		1165–1040	CO (éter)
		1300	CO (carboxila)
1590–1500		C=C (aromático)	
2927		Alifático CH	
3062		CH (aromático)	
3200		OH (quelato)	
AgNP-BO	825	Anel aromático (2 H adjacentes)	
	1030–1018	CO (éter)	
	1350–1300	CO (éster)	
	1648	C=O (amidas)	
	2929–2900	Alifático CH	
	3400–3263	OH (quelato)	
	AgNP-CPP	840–790	$R_2 C=CHR$ (CH fora do plano)
		1160–1021	CO (éter)
1289		NC (aromático)	
1490		NH	
1625		C=C (aromático)	
2936		OH (quelato)	
3330		NH livre (amina secundária)	
945		$RCH=CH_2$	
AgNP-EN	1190–1026	CO (éteres)	
	1336	SO_2 (sulfona)	
	1500	C=C (aromático)	
	2360	CO_2	
	2934	OH (quelato)	
	3343	NH livre (aminas secundárias)	
	AgNP-ER	820–798	$R_2 C=CHR$
		1170–1025	CO (éter)
		1312	SO_2 (sulfona)
1493		NH	
1621		C=C (aromático)	
2936		Alifático CH	
3230		OH (quelato)	
AgNP-FP		835–820	anel aromático
	1168–1020	CO (éter)	
	1300	CO (éster)	
	1490	NH	
	1550	NH_2	
	1630	C=O (amidas)	
	1790	C=O (cloreto de acilo)	
	2925	CH (alifático)	
	3055	CH (alceno)	
	3200	OH (quelato)	

Fonte: Ribeiro et al. (2023).