

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E  
BIOLOGIA MOLECULAR

**THAIANE ALCARDE ROBELDO**

**AVALIAÇÃO DE TRÊS NANOPARTÍCULAS FUNCIONAIS COM ATIVIDADE  
CITOTÓXICA PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER DE BEXIGA**

São Carlos-SP

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E  
BIOLOGIA MOLECULAR

**THAIANE ALCARDE ROBELDO**

**AVALIAÇÃO DE TRÊS NANOPARTÍCULAS FUNCIONAIS COM ATIVIDADE  
CITOTÓXICA PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER DE BEXIGA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra

Co-Orientador: Prof. Dr. Elson Longo da Silva

São Carlos-SP

2022



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

## Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Thaiane Alcarde Robeldo, realizada em 20/04/2022.

### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra (UFSCar)

Prof. Dr. Elson Longo da Silva (UFSCar)

Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo (UFSCar)

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal (UFSCar)

Profa. Dra. Camila Cristina de Foggi (UFRGS)

Prof. Dr. Ivo Mateus Pinatti (UNESP)

## DEDICATÓRIA

Muito tempo atrás, eu ainda criança e sentada no seu colo, você me disse que eu seria a sua Doutora. Naquele tempo eu não fazia a menor ideia do que isso significava, mas a única coisa que eu sabia é que eu iria seguir as suas palavras, meu vô.

Quando eu passei no vestibular e você me olhou com os olhos cheios de lágrimas, eu soube que eu estava no caminho certo. E logo você se foi.

Você se foi e hoje eu aprendi o que aquelas palavras significavam. Só eu e você sabemos o que tudo isso significa.

E agora me torno a sua Doutora, meu vô.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me permitir a grande oportunidade de seguir meus sonhos e jamais desistir dos meus objetivos. Serei sempre muito grata pela vida e pelo caminho que estou trilhando.

Agradeço a meus pais Edna e Pedro. Não sei o que seria de mim sem vocês. Obrigada por todas as oportunidades que me proporcionaram de estudar e me tornar aquilo que eu mais quero. Obrigada sempre pelos conselhos, conversas, ensinamentos, parcerias, amor e sempre a mão estendida nos momentos que eu mais precisei até aqui (que não foram poucos).

Agradeço muito ao apoio incondicional de meu irmão Thiago. Obrigada por tantas vezes me ouvir, me orientar, enxugar as minhas lágrimas e me fazer enxergar que o caminho é duro, mas pode ser vencido. Me inspiro sempre em você em todos os sentidos.

Um obrigada muito especial a pessoas que desde sempre me acompanharam e torceram por mim, e eu não poderia deixar de citar especialmente elas. Minhas primas Nádia e Marciana, vocês sempre que estiveram em todos os momentos da minha vida e fazem parte de tudo isso ao meu lado.

Agradeço a cada um de minha família, que sempre torceu pelo meu sucesso. Tias, tios, primas, primos, vó... vocês são meu alicerce!

Gratidão enorme as minhas amigas de pós graduação Patrícia, Nayore, Luana, Camila, Diana e Bianca. A pós graduação é um caminho árduo e cheio de desafios. Não sei o que seria desse Doutorado sem a companhia e amizade de vocês. Vocês moram no meu coração.

Obrigada a irmã que a vida me deu, Camila Brolo. Por ser parte essencial, não só desse trabalho, mas da minha vida. Obrigada pela amizade, respeito e compreensão por tantas vezes. Deus não move uma folha se não for à vontade Dele...

Obrigada aos meus irmãos que a ciência me deu, Camila e Ivo. Por tanto respeito, admiração mútua, ensinamentos, amizade, parcerias e muitas histórias. Vocês são fundamentais na minha vida. Obrigada por tanto! Obrigada por tudo!

Obrigada aos meus amigos de fé!

Obrigada ao Professor Dr. Emerson Camargo por tantos conselhos, conversas, orientações acadêmicas e pessoais. Levarei todas as palavras para minha vida.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Obrigada ao Professor Dr. Ricardo Carneiro Borra, sempre muito solícito, que desde sempre me abriu as portas de seu laboratório (mesmo com um único microscópio e mais nada). Obrigada por tudo que me ensinou, pelas conversas além da ciência, pensamento, respeito e formação. Obrigada sempre.

Obrigada ao Professor Dr. Elson Longo por ser sempre muito solícito e aceitar ser meu co-orientador. É imensurável a satisfação em poder ter essa oportunidade.

Obrigada ao Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais (CDMF) pela parceria nesse projeto de Doutorado e por tantos amigos que guardo no coração com muito carinho.

Obrigada ao Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) pelo curso de Doutorado, pelo qual estou me formando. Obrigada à CAPES pela bolsa recebida no período.

*“Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação”*

*(John Dewey)*

## RESUMO

### AVALIAÇÃO DE TRÊS NANOPARTÍCULAS FUNCIONAIS COM ATIVIDADE CITOTÓXICA PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER DE BEXIGA

O câncer de bexiga é considerado uma das neoplasias mais incidentes no mundo. Embora a quimioterapia, cirurgia, imunoterapia e terapia por radiação tenham sido aceitas e praticadas por décadas, alguns pacientes podem não responder aos métodos devido à extensão da doença e a baixa especificidade dos tratamentos. No entanto, a busca por novos tratamentos mais específicos e com menos efeitos colaterais são de vital importância para a erradicação dessa doença. Nanopartículas (NPs) foram investigadas contra uma variedade de tipos de câncer e relatadas como uma alternativa a muitos quimioterápicos não seletivos. Diante dessa problemática, a utilização de NPs como método de tratamento ao câncer de bexiga pode se tornar uma alternativa, diminuindo os danos adversos provocados pelos tratamentos convencionais. Assim, o objetivo dessa Tese de Doutorado foi investigar os efeitos citotóxicos e os principais mecanismos de ação NPs com rotas de síntese aprimoradas para o tratamento do câncer de bexiga. Para tanto, utilizamos o Tungstato de Prata ( $\text{Ag}_2\text{WO}_4$ ) irradiado de diferentes formas, Fosfato de Prata decorado com ouro ( $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$ ) e Dióxido de Titânio recoberto com agrupamentos peróxidos [ $\text{Ti}(\text{OH})_4$ ]. Nesse trabalho, observou-se que as modificações estruturais aumentam a capacidade citotóxica e seletiva das nanopartículas, possibilitando o uso para potenciais tratamentos contra o carcinoma de bexiga.

**Palavras chaves:** Câncer de bexiga, nanopartículas, seletividade, citotoxicidade



## ABSTRACT

### EVALUATION OF THREE FUNCTIONAL NANOPARTICLE WITH CYTOTOXIC ACTIVITY FOR THE TREATMENT OF BLADDER CANCER

Bladder cancer is considered one of the most frequent neoplasms in the world. Although chemotherapy, surgery, immunotherapy and therapy have been accepted and practical methods for decades, they may not respond to due to the extent of the disease and the low specificity of treatments. However, the Search for new treatment that are more specific and with less beneficial effects are of vital importance for the eradication of the disease. Nanoparticles (NPs) have been investigating against a variety of cancer types and listed as an alternative to many non-selective chemotherapeutics. NPs in the face of this problematic NP as the treatment method wick become an alternative use, to use the damage caused by cancer of alternative treatment. Thus, this objective was to investigate the cytotoxic effects and the main mechanisms of synthesis of NPs actions with the improved routes for the treatment of bladder cancer. For that, we used Silver Tungstate ( $\text{Ag}_2\text{WO}_4$ ) irradiates in different forms, Silver Phosphate gold-doped ( $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$ ) and Titanium Dioxide coated with peroxide groups [ $\text{Ti}(\text{OH})_4$ ]. The use of a treatment to work, allowed the use of an emergency treatment and the ability to treat a nanoparticle, Against cancer treatment.

**Keyword:** Bladder cancer, nanoparticles, selectivity, cytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Esquema representativo da evolução e progressão do câncer de bexiga. (Cis) carcinoma *in situ*- lesão plana não invasiva com altas taxas de recorrência e progressão (NMIBC); (Ta) carcinoma papilar muscular não-invasivo (NMIBC); (T1) início da progressão de invasão tumoral da lâmina própria (NMIBC); (T2a) progressão tumoral muscular interna (MIBC); (T2b) progressão tumoral muscular externa (MIBC); (T3) início da invasão tumoral para tecidos adjacentes (MIBC); (T4) metástase. Figura adaptada de Sanli, J et. Al, 2017 (SANLI et al., 2017).

**Figura 2.** Bexiga urinária. Esquema representativo das camadas que compõe a cavidade da bexiga. Epitélio estratificado com a extremidade composta pelas células guarda-chuva, responsável pela manutenção da permeabilidade do sistema urinário; tecido muscular detrusor e tecido conjuntivo, responsáveis pelos movimentos de eliminação dos descartes da urina. Figura adaptada de: Atlas de Histologia. Michael Roos, 2012.

**Figura 3.** Esquemática das barreiras terapêuticas contra câncer de bexiga. (A) Desordem no sistema vascular impedindo a difusão equilibrada das drogas sobre as células tumorais; (B) Baixa concentração de O<sub>2</sub> no tecido tumoral impede a ação efetiva de agentes antitumorais específicos ao tratamento; (C) Resposta imunológica e a polarização de TAM em função do desenvolvimento tumoral. Figura produzida com auxílio de BioRender.

**Figura 4:** Comparação entre nanopartículas com moléculas e materiais de tamanhos distintos, variando de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>8</sup> nm. Figura adaptada de ESTUDIOS DE LA INTERACCIÓN PÉPTIDO-DENDRÍMERO A TRAVÉS DE SIMULACIONES COMPUTACIONALES.

**Figura5:** Esquema representativo de nanopartículas no tratamento *in situ*. Figura produzida com auxílio de BioRender.

**Figura 6:** Esquema representativo da Terapia Fotodinâmica utilizando nanopartículas. Figura produzida com auxílio de BioRender.

**Figura 7.** Imagem obtidas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM) das amostras de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> obtidas após as respectivas radiações: (A)  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>; (B)  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:E (C)  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:NF; (D)  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:F. Fonte: Autoria própria.

**Figura 8.** Viabilidade de células MB49 e BALB/3T3 expostas às diferentes amostras de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> nas diferentes concentrações: 4,63; 11,58;23,16; 46,31  $\mu$ g/ml respectivamente, por 24 h (n=3). (A) Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:N; (B) Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:E; (C) Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:NF; (D) Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:F. As barras representam os valores médios  $\pm$  o erro padrão médio (SEM). As diferenças estatísticas foram estabelecidas por ANOVA de dois fatores

com análise post-hoc usando o teste de Dunnett. Os valores estatisticamente significantes foram:  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,01$  (\*\*). Fonte: Autoria própria.

**Figura 9.** Gráfico representativo da análise da produção de EROs por amostras de AgNPs/ $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>. Para cada amostra (N; E, NF, F) foram adicionados BQ (quantifica a produção de O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) e TBA (quantifica a produção de OH<sup>\*</sup>). A diminuição das barras demonstra a produção de cada tipos de EROs). As diferenças estatísticas foram estabelecidas por ANOVA de dois fatores com análise post-hoc usando o teste de Dunnett. Os valores estatisticamente significantes foram:  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,1$  (\*). Fonte: Autoria própria.

**Figura 10.** Detecção intracelular de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por células BALB/3T3 e MB49, expostas às amostras de: (A) Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:N; (B) Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:E; (C) Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:NF; (D) Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:F, na concentração de 23.16 µg/mL respectivamente até 105 min. Fonte: Autoria própria.

**Figura 11.** Ensaio de morte celular (apoptose e necrose). AO/EB: laranja de acridina/brometo de etídio. (A) células controle BALB/3T3 ausentes de apoptose, não apresentam regiões de ligação nuclear aos fluoróforos; (B) células controle BALB/3T3 ausentes da necrose, impermeáveis ao EB; (C) células controle MB49 ausente da apoptose, não apresentam regiões de ligação nuclear aos fluoróforos; (D) células de controle MB49 ausentes da necrose, impermeáveis ao EB; (E) células BALB/3T3 exposto ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> ausência de morte por apoptose; (F) células BALB/3T3 exposto ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> ausência quantidade de morte por necrose; (G) células MB49 exposto ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> grande quantidade de morte por apoptose; (H) células MB49 exposto ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> ausência de morte necrótica; (I) células BALB/3T3 expostas ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:F, ausência de morte por apoptose; (J) células BALB/3T3 expostas ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:F, ausência de morte por necrose; (K) células MB49 expostas ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:F, grande quantidade de morte por apoptose; (L) células MB49 expostas ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:F, grande quantidade de morte por necrose; (M) células BALB/3T3 expostas ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:NF, ausência de morte por apoptose; (N) células BALB/3T3 expostas ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:NF, ausência de morte por necrose; (O) células MB49 expostas ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:NF, ausência de morte por apoptose; (P) células MB49 expostas ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:NF, grandes quantidade de morte por necrose; (Q) células BALB/3T3 expostas ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:E, ausência de morte por apoptose; (R) células BALB/3T3 expostas ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:E, ausência de morte por necrose; (S e T) detritos de células MB49 exposto ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:E. Fonte: Autoria própria.

**Figura 12:** Viabilidade de células MB49 e L929 expostas à diferentes concentrações de (A) Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e (B) Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:Au, por 24 horas; Comparação da viabilidade das células (C) MB49 e (D) L929, expostas a Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:Au; Viabilidade de células MB49 e L929 expostas ao (E) Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e (F) Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:Au na concentração de 0.12 mg/mL em diferentes tempos. Cada ponto representam os valores médios dos grupos e o erro padrão médio (SEM) da triplicata. As diferenças estatísticas foram estabelecidas pelo teste ANOVA de dois fatores com análise post-hoc usando o teste de Dunnett. Valores estatisticamente significativos:  $p < 0,001$  (\*\*\*) . Fonte: Autoria própria.

**Figura 13:** Ensaio qualitativo de determinação de morte celular por marcação com os fluoróforos laranja de acridina (em verde) e brometo de etídio (em vermelho), após exposição a  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$  na concentração de 0.12 mg/mL por 1 hora. (A) Grupo controle de células viáveis da linhagem L929; (B) Grupo controle da linhagem L929 morto por apoptose e necrose (Camptotecina 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); (C) Células L929 tratadas com células  $\text{Ag}_3\text{PO}_4^-$  -predomínio de células que não mostraram morte celular; (D) Células L929 tratadas com  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$  - predomínio de células que não mostraram morte celular; (E) Grupo controle de células viáveis da linhagem MB49; (F) Grupo controle da linhagem MB49 morta por apoptose tardia (Camptotecina 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); (G) Células MB49 tratadas com células  $\text{Ag}_3\text{PO}_4^-$  - mostraram morte celular por necrose; (H) Células MB49 tratadas com  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$ - mostraram predominantemente morte celular por apoptose tardia. As imagens foram obtidas no aumento de 20X. Fonte: Autoria própria.

**Figura 14.** (A) Comparação da degradação fotocatalítica de RhB de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$  na presença dos capturadores TBA (identificando  $\text{OH}^*$ ) e BQ (identificando  $\text{O}_2^{\cdot -}$ ), sob irradiação de luz visível; (B) Cinética de quantificação de EROs intracelular por MB49 e L929, no intervalo de 0 a 100 min de exposição à  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$ . As esferas representam os valores médios de EROs dos grupos em cada momento e o erro padrão médio (EPM) do triplicata. Fonte: Autoria própria.

**Figura 15.** Efeito de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$  na formação de colônias de células MB49. (A) Gráfico do número de colônias normalizadas em relação ao controle ( $n = 3$ ). As colunas representam os valores médios dos grupos e o erro padrão médio (EPM). As diferenças estatísticas foram feitas usando o teste Anova de dois fatores com análise post-hoc usando o teste de Dunnett. (\*\*\*) Valores estatísticos com  $p < 0,001$ ; (B) Viabilidade das células referente ao ensaio de formação de colônias após 5 dias da exposição; (C) A imagem corresponde ao ensaio de formação de colônia de uma réplica representativa de três experimentos independentes cultivados por 5 dias após a exposição. Fonte: Autoria própria.

**Figura 16.** Efeito de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$  na formação de colônias de células MB49. (A) Gráfico da medida de área livre medido após os respectivos períodos de análise. As linhas representam a média  $\pm$  SEM medições da área de célula relativa ao longo dos quatro intervalos de tempo e o erro padrão médio (EPM). As diferenças estatísticas foram feitas usando o teste Anova de dois fatores com análise post-hoc usando o teste de Dunnett. (\*\*\*) Valores estatisticamente comprometidos com  $p < 0,001$ . (B) Imagem correspondente ao teste de migração de uma réplica representativa de três experimentos independentes e analisada após 0, 12, 24 e 48 horas de exposição ( $n = 3$ ). A imagem corresponde a uma réplica representativa de três experimentos independentes. Imagens com ampliação de 20X. Fonte: Autoria própria.

**Figura 17.** Ensaio de citotoxicidade de células não tumorais (L929) e de tumor da bexiga (MB49) expostas a  $\text{Ti}(\text{OH})_4$  nas seguintes concentrações: 0.25; 0.5; 1.0; 5.0; e 10.0 mg /ml em diferentes condições ( $n = 4$ ). (A) Sistema composto por uma caixa (10,5x22x23cm) contendo um led de luz visível para ativar o  $\text{Ti}(\text{OH})_4$ ; (B) Sistema de luz visível projetado para liberar cerca de 5,16  $\text{mW}/\text{cm}^2$  de energia,

distribuída por fótons com comprimento de onda entre 400 e 750 nm contendo dois picos (440 e 550 nm) e um vale em 475 nm; (C) MB49 e (D) L929 exposto a  $\text{Ti(OH)}_4$  ativado ou não ativado pela luz visível (1h) e imediatamente incubado por 24h no escuro; (E) Comparação da medição da citotoxicidade das células MB49 e L929 quando expostas ao  $\text{Ti(OH)}_4$  ativado por 1 hora sob luz visível e incubado por 12 horas no escuro; (F) Comparação da medição da citotoxicidade das células MB49 e L929 quando expostas ao  $\text{Ti(OH)}_4$  ativado por 1 hora sob luz visível e incubado por 24 horas no escuro. Os pontos representam os valores médios  $\pm$  o erro padrão médio (SEM). As diferenças estatísticas foram estabelecidas por ANOVA de dois fatores com análise post-hoc usando o teste de Dunnett. Os valores estatisticamente significativos foram  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,1$  (\*). Fonte: Autoria própria.

**Figura 18.** Mecanismo proposto para geração de ROS por  $\text{Ti(OH)}_4$ . Degradação fotocatalítica de RhB de  $\text{Ti(OH)}_4$  na presença de TBA sob irradiação de luz visível. A diminuição na barra representa a produção e captura de  $\text{OH}^*$  pela TBA. Fonte: Autoria própria.

**Figura 19.** (A) Representação da produção de ROS por  $\text{Ti(OH)}_4$  por ativação de luz visível; (B) Quantificação de ROS intracelulares em células MB49 expostas a  $\text{Ti(OH)}_4$  ativadas por 1 hora com luz visível nas seguintes concentrações: 0.25; 0.5; 1.0; 5.0; 10.0 mg/mL ( $n = 4$ ). A solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi usada como um controle positivo para induzir o estresse oxidativo nas células (10  $\mu\text{mol/L}$  por 30 min de exposição). As células sem qualquer tratamento foram utilizadas como controle negativo (CT). As colunas representam os valores médios  $\pm$  erro padrão médio (SEM). As diferenças estatísticas foram estabelecidas por ANOVA de um fator com análise post-hoc usando o teste de Tukey. Grupos com letras diferentes foram considerados estatisticamente diferentes entre si com  $p < 0,01$ . Autoria própria.

**Figura 20:** (A) Ensaio de citotoxicidade de células MB49 expostas a  $\text{Ti(OH)}_4$  em três regimes de reexposição nas seguintes concentrações: 0.1; 0.5; 1.0; 5.0 e 10.0 mg/mL ( $n = 4$ ); Tratamento I: exposição a uma dose de  $\text{Ti(OH)}_4$  e quantificação da citotoxicidade após 12 horas de incubação no escuro; Tratamento II: exposições a duas doses de  $\text{Ti(OH)}_4$  com intervalos intermediários de cultivo de 12 horas e quantificação da citotoxicidade após 24 horas de incubação no escuro; Tratamento III: exposições a três doses de  $\text{Ti(OH)}_4$  com intervalos intermediários de cultivo de 12 horas e quantificação da citotoxicidade após 36 horas de incubação no escuro. As colunas representam os valores médios dos grupos  $\pm$  o erro padrão da média (SEM). As diferenças estatísticas foram estabelecidas por ANOVA de dois fatores com análise post-hoc usando o teste de Dunnett. Valores estatisticamente significativos (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; (B) Imagem representativa das mudanças morfológicas das células MB49 expostas a um regime de 3 doses subsequentes de  $\text{Ti(OH)}_4$  a uma concentração de 0.5 mg/mL. Imagens capturadas com ampliação de 20X. Fonte: Autoria própria.

**Figura 21:** Identificação do tipo de morte celular causada em células MB49 expostas a 3 doses de  $\text{Ti(OH)}_4$  na concentração de 0.5 mg/mL em intervalos de 12 horas. Grupo de controle não tratado exposto a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10  $\mu\text{M}$  por 2 horas). Quantificação por citometria de fluxo. (A) Gráficos de conjugados

fluorescentes de 7AAD vs. anexina V usados para classificar subpopulações em: (Q1) população de células em morte celular por necrose; (Q2) população de células em estágio final de morte celular por apoptose; (Q3) população de células nos estágios iniciais de morte celular por apoptose; (Q4) população de células predominantemente viável. (B) Gráfico de barras horizontais mostrando as quantidades significativas de células vivas, apoptóticas e necróticas presentes em cada grupo analisado  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas foram estabelecidas por ANOVA de dois fatores com análise post-hoc usando o teste de Bonferroni. Valores estatisticamente significativos (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Ao lado, um gráfico numérico mostra a predominância de cada subpopulação de células para cada grupo analisado. Fonte: Autoria própria.

**Figura 22.** Quantificação de vacúolos lisossomais ácidos, ativação da caspase-3 e potencial elétrico mitocondrial de células MB49 expostas a  $\text{Ti}(\text{OH})_4$  a uma concentração de  $6 \mu\text{g/mL}$  ativadas por 1h de luz visível por 1 hora e 12 horas de incubação em o escuro. (A) Ensaio qualitativo potencial de membrana mitocondrial: imagens de células que mostram a diferença na intensidade de fluorescência produzida pela exposição de células à Rodamina 123 no grupo controle (menor intensidade de fluorescência) em comparação com o grupo tratado (maior intensidade de fluorescência). O gráfico de barras oposto compara quantitativamente a intensidade de fluorescência relativa média  $\pm$  SEM do grupo tratado em comparação com o grupo de controle. As imagens foram adquiridas com ampliação de 40X; (B) Ensaio de vermelho neutro de quantificação de vacúolo lisossomal ácido: gráfico de barras dos índices de unidade de excesso de vacúolo ácido intracelular (AAU) calculados por  $\pm$  SEM média com dados coletados de ensaios de viabilidade em relação à absorção de vermelho neutro (AAU)  $> 1$  representa a célula do tipo II morte); (C) Ensaio qualitativo vacúolos de ácido lisossomal: imagens de células MB49 expostas ao fluoróforo laranja de acridina, mostrando as diferenças morfológicas entre o grupo controle que exibe intensa atividade fluorescente no núcleo (filtro FITC - 525 nm), em comparação com os grupos tratados com  $\text{Ti}(\text{OH})_4$ , que exibe pouca atividade fluorescente no núcleo, que contém granulações com maior intensidade fluorescente no citoplasma (Texas Red Filter - 650 nm); (D) Gráfico de barras comparando a atividade média da enzima caspase-3  $\pm$  SEM do grupo tratado em relação ao grupo controle que quantificou a atividade enzimática aplicando o kit EnzChek® Caspase-3. Fonte: Autoria própria.

**Figura 23.** Efeito na formação de colônias e migração de células MB49 após exposição a 3 doses subsequentes de  $\text{Ti}(\text{OH})_4$  a uma concentração de  $6 \mu\text{g/mL}$  ativada por 1h de luz e 12h de incubação no escuro ( $n=4$ ). (A) Ensaio qualitativo de formação de colônias: imagem correspondente à réplica representativa de três experimentos independentes cultivados por 5 dias após as respectivas exposições, mostrando a inibição da proliferação celular exposta a uma concentração abaixo do subletal; (B) Formação de colônias no ensaio quantitativo: número de colônias normalizadas em relação ao grupo controle, mostrando estatisticamente as diferenças encontradas no ensaio qualitativo. As colunas representam os valores médios dos grupos e o erro padrão da média (SEM). As diferenças estatísticas

foram estabelecidas pelo teste ANOVA de duas vias com análise post-hoc usando o teste de Dunnett. Valores estatisticamente significativos (\*\*\*)  $p < 0,001$ . (C) Ensaio qualitativo de migração celular: imagem correspondente à réplica representativa de três experimentos independentes após 3 doses subsequentes e analisada após 0h, 12h, 24h e 48h de exposição, mostrando a inibição da migração celular para o espaço determinado quando exposta a uma concentração abaixo subletal. Imagens com ampliação de 20X. (D) Migração de células de ensaio quantitativo: gráfico de barras comparando a média  $\pm$  SE SEM medições da área livre de células relativa ao longo dos quatro intervalos de tempo. As colunas representam os valores médios dos grupos e do SEM. As diferenças estatísticas foram estabelecidas por ANOVA de dois fatores com análise post-hoc usando o teste de Dunnett. Valores estatisticamente significativos (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; (\*)  $p < 0,1$ . Fonte: Autoria própria.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAU Índice unitário de excesso de vesículas ácidas
- AgNPs Nanopartículas de prata
- Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> Fosfato de prata
- Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:Au Fosfato de prata decorado com ouro
- Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> Tungstato de prata
- AO/EB Laranja de acridina/etídio brometo
- Apaf-1 Fator 1 de ativação da protease apoptótica
- AuNP Nanopartícula de ouro
- BALB/3T3 Fibroblastos saudáveis murino
- BCG Bacillus Calmette-Guérin
- BQ Benzoquinona
- Ca<sup>2+</sup> Íons Cálcio
- CB Banda de condução
- CCL Quimiocina de motivo C-C
- CP Co-precipitação simples
- CUB Carcinoma urotelial de bexiga
- CXCL Quimiocinas C-X-C ligante
- CT Controle
- DATASUS Dados do Sistema Único de Saúde Brasileiro
- DCF-DA 2', 7' diacetato-diclorofluoresceína
- DMEM Meio de cultura (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- DOX Doxorubicina
- DP Desvio padrão
- ECM Matriz extracelular
- EPR Efeito de permeabilidade e retenção aprimorada
- EROs Espécies reativas de oxigênio
- Fs Laser femtossegundo
- FE-SEM Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo
- GPx Glutathione peroxidase



- HÁ Ácido hialurônico
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Peróxido de hidrogênio
- IFN- $\gamma$  Interferon  $\gamma$
- ILs Citocinas
- INCA Instituto Nacional do Cancer
- lncRNA RNAs longos não codificantes
- J774 Linhagem de macrófagos diferenciados murinos
- LPS Lipopolissacarídeos
- L929 Fibroblastos saudáveis murino
- MB49 Células tumor de bexiga murino
- miRNAs micro RNAs
- MHC Complexo principal de histocompatibilidade
- MIBC Carcinoma de bexiga muscular invasivo
- MMP-9 Metaloproteinase-9 de matriz
- MnO<sub>2</sub> Dióxido de manganês
- MNPs Nanopartículas magnéticas
- M1 Macrófago polarizado antitumoral
- M2 Macrófago polarizado pró-tumoral
- NADPH Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
- NEED Diamina di-hidroclorido naftaleno
- NF- $\kappa$ B Fator de transcrição
- NMIBC Carcinoma de bexiga muscular não invasivo
- NO Óxido nítrico
- NP Nanopartícula
- O<sub>2</sub><sup>-</sup> Ânion superóxido
- OH<sup>•</sup> Radicail hidroxila
- OMS Organização Mundial da Saúde
- PARP-1 Inibidores de reparo de quebras de DNA
- PBS Solução salina tamponada com fosfato
- PDGF-  $\beta$  Fator de crescimento derivado de plaquetas-  $\beta$
- PDT Terapia fotodinâmica
- pI Ponto isoelétrico

- PS Fotossensibilizador
- PTT Terapia fototérmica
- SEM Erro padrão médio
- RhB Rodamina B
- SCC Carcinoma de células escamosas
- SFB Soro fetal bovino
- SOD Superóxido dismutase
- STAT3 Transdutor da ativação da transcrição 3
- RIP1 Receptor 1
- TAM Macrófago microambiente tumoral
- TBA Álcool terc-butílico
- TGF- $\beta$  Fator de crescimento tumoral-  $\beta$
- TNF- $\alpha$  Fator de necrose tumoral- $\alpha$
- TME Microambiente tumoral
- TURBT Ressecção transuretral do tumor de bexiga
- TiO<sub>2</sub> Dióxido de titânio branco convencional
- Ti(OH)<sub>4</sub> Nanopartículas de TiO<sub>2</sub> revestidas com grupos de peróxido
- UV Luz ultravioleta
- VB Banda de valência
- VEGFs Fator de crescimento endotelial vascular

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
1.2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
1.2.1. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	4
1.2.2. CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE BEXIGA.....	5
1.2.3. ETIOPATOGENIA .....	6
1.2.4. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO CÂNCER DE BEXIGA .....	9
1.2.5. BARREIRAS TERAPEUTICAS .....	11
1.2.6. NANOTECNOLOGIA .....	14
1.2.7. NANOTECNOLOGIA NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE BEXIGA.....	16
1.2.7.1. UTILIZAÇÃO DE NP <i>IN SITU</i> .....	17
1.2.7.2. UTILIZAÇÃO DE NPs NA TERAPIA FOTODINÂMICA.....	19
1.3. OBJETIVOS GERAIS .....	21
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>22</b>
RESUMO .....	23
ABSTRACT.....	24
2.1. INTRODUÇÃO .....	25
2.2. OBJETIVOS.....	27
2.2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	27
2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
2.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	28
2.2.2. Síntese de $\alpha$ -Ag <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .....	28
2.2.3. Irradiação de $\alpha$ -Ag <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> por elétrons .....	28
2.2.4. Irradiação $\alpha$ -Ag <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> por Femtossegundo.....	28
2.2.5. Cultura Celular.....	29
2.2.6. Viabilidade celular em exposição as amostras de $\alpha$ -Ag <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> . .....	29
2.2.7. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio por amostras de $\alpha$ -Ag <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .....	29
2.2.8. Quantificação intracelular de espécies reativas de oxigênio.....	30
2.2.9. Ensaio de morte celular: apoptose e necrose .....	30
2.2.10. Análises estatísticas .....	31
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
2.3.1. Caracterização de $\alpha$ -Ag <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .....	32
2.3.2. Viabilidade celular expostas as amostras de $\alpha$ -Ag <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .....	33

2.3.2.	Produção de Espécies Reativas de Oxigênio por amostras de $\alpha$ -Ag <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .....	35
2.3.3.	Morte Celular: apoptose e necrose.....	39
2.4.	CONCLUSÃO .....	42
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>		<b>44</b>
	RESUMO .....	45
	ABSTRACT.....	46
3.1.	INTRODUÇÃO .....	47
3.2.	OBJETIVOS.....	49
3.2.1.	OBJETIVOS GERAIS .....	49
3.2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
3.3.	MATERIAL E MÉTODOS .....	50
3.3.1.	Síntese de Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> e Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> :Au .....	50
3.3.2.	Cultura de MB49 e L929 .....	50
3.3.3.	Viabilidade celular na exposição das amostras em diferentes concentrações.....	50
3.3.4.	Viabilidade celular em diferentes tempos de exposição .....	51
3.3.5.	Citotoxicidade: Apoptose e Necrose.....	51
3.3.6.	Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) por Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> e Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> :Au .....	52
3.3.6.	Quantificação Intracelular de EROS .....	52
3.3.7.	Teste de Formação de Colônia.....	52
3.3.8.	Ensaio de migração celular .....	53
3.3.9.	Análise estatística .....	54
3.4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
3.4.1.	A influência da concentração e do tempo de exposição de Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> e Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> :Au na viabilidade de células MB49 e L929 .....	55
3.4.2.	Determinação do tipo de morte celular .....	57
3.4.3.	Determinação da Produção de EROS por Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> e Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> :Au .....	59
3.4.4.	Efeito de Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> e Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> :Au na capacidade clonogênica e migratória de células MB49	62
3.5.	CONCLUSÃO .....	65
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>		<b>66</b>
	RESUMO .....	67
	ABSTRACT.....	68
4.1.	INTRODUÇÃO .....	69
4.2.	OBJETIVOS.....	71

4.2.1.	OBJETIVOS GERAIS .....	71
4.2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	71
4.3.	MATERIAL E MÉTODOS .....	72
4.3.1.	Síntese de $Ti(OH)_4$ .....	72
4.3.2.	Identificação EROs produzida por $Ti(OH)_4$ .....	72
4.3.3.	Culturas de células L929 e MB49.....	73
4.3.4.	Viabilidade celular na exposição ao $Ti(OH)_4$ na ausência e na exposição à luz visível	73
4.3.5.	Ensaio de quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular.....	74
4.3.6.	Viabilidade das células MB49 em relação à reexposição ao $Ti(OH)_4$ ativado .....	74
4.3.7.	Efeito na capacidade clonogênica das células MB49 em relação à reexposição ao $Ti(OH)_4$ ativado	74
4.3.8.	Efeito do $Ti(OH)_4$ ativado na migração celular avaliada pelo ensaio de fechamento de risco (Would Healing Assay).....	75
4.3.9.	Caracterização da morte celular após tratamento com $Ti(OH)_4$ ativado.....	75
4.3.9.1.	Identificação do tipo de morte celular .....	75
4.3.9.2.	Quantificação Lisossomal.....	76
4.3.9.3.	Quantificação do Potencial Elétrico Mitocondrial.....	77
4.3.9.4.	Atividade da enzima caspase-3 .....	77
4.3.10.	Análise estatística .....	77
4.4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	78
4.4.1.	Influência do tempo de contato e ativação do $Ti(OH)_4$ na viabilidade das células MB49	78
4.4.2.	Efeito do $Ti(OH)_4$ ativado nos níveis de EROs intracelulares.....	81
4.4.3.	Influência do número de reexposições ao $Ti(OH)_4$ ativado na citotoxicidade de células MB49	83
4.4.4.	Determinando o tipo de morte celular .....	85
4.4.5.	Efeito do $Ti(OH)_4$ na capacidade clonogênica e migratória de células MB49 .....	89
4.5.	CONCLUSÃO .....	91

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

De forma geral, as neoplasias malignas, conhecidas popularmente como câncer, representam um conjunto de doenças que pode afetar qualquer tecido do corpo e tem em comum, o crescimento celular independente (MCCONKEY; CHOI, 2018) que se manifesta quando surgem mutações em regiões de controle dos processos de divisão e/ou morte celular (RYCAJ; TANG, 2015; TANG, 2012; VISVADER, 2011). Existem evidências de que diversos tipos de neoplasias malignas sejam organizados a partir de células autorrenováveis, as quais funcionam como repositório de células tumorais (VISVADER; LINDEMAN, 2008). O câncer não tem uma causa única. As mudanças provocadas no ambiente pelo próprio homem, os hábitos e o estilo de vida (causas externas), podem alterar a estrutura genética (causa interna) das células, aumentando o risco de surgimento de diferentes tipos de neoplasias malignas. Apesar dos fatores genético exercerem importante papel na formação dos tumores (oncogênese), são raros os casos de câncer que se originam exclusivamente em função de alterações do DNA (LENIS; LEC; CHAMIE, 2020).

Por ano, aproximadamente 18 milhões de novos casos de câncer são diagnosticados em todo o mundo (BRAY et al., 2018). Para o ano de 2040, espera-se um aumento mundial no número de diagnósticos, chegando a 29,5 milhões de novos casos e 16,4 milhões de mortes. A estimativa para o Brasil, para o próximo triênio (2020 a 2022), é de que as taxas de ocorrência de câncer sejam de, em média, 625 mil novos casos, por ano (INCA, 2020). Os tipos de câncer de maior frequência entre os homens são os: de próstata (21,7%), de pulmão (9,5%), colorretal (8%), de bexiga (4,6%) e de estômago (2,9%); e entre as mulheres: de mama (25,2%), de pulmão (8,5%), colorretal (8,2%), de tireóide (5,4%) e cervical (3,9%) (WHO, 2022)

Em média, de todos os novos casos de câncer no mundo, aproximadamente 4% das mortes são decorrentes do câncer de bexiga (BRAY et al., 2018). Segundo dados da Organização das Nações Unidas são esperados um aumento no número de diagnósticos de câncer de bexiga, de 7,6 bilhões para 8,5 bilhões de pessoas em 2030 e passando de 9,7 bilhões até 2050 (RICHTERS; ABEN; KIEMENEY, 2020). Segundo os últimos registros de 2020 do Instituto Nacional do Câncer foi estimado para o Brasil, 10.640 novos casos de câncer de bexiga, sendo 7.590 em homens e 3.050 em mulheres e 4.517 mortes, sendo 3.115 homens e 1.402 mulheres.

O tratamento mais indicado para câncer de bexiga é a ressecção transuretral completa seguido de quimioterapia, radioterapia ou imunoterapia, dependendo do subtipo, para reduzir a recorrência ou prevenir a progressão para doença muscular invasiva (TANG et al., 2021). Os

agentes quimioterápicos incluem principalmente epirrubicina, tetra-hidropiranyl-adriamicina (CHEN et al., 2012), gencitabina (BÖHLE et al., 2009) e mitomicina C (SCHMIDT et al., 2020), os quais exercem suas atividades antineoplásicas, induzindo a morte celular. Embora os tratamentos possam ser benéficos, os efeitos colaterais são problemáticos, os quais incluem: coágulos sanguíneos nas pernas ou pulmões, danos em órgãos próximos, infecção, incontinência urinária, bloqueio do fluxo de urina e comprometimento das funções sexuais (LENIS; LEC; CHAMIE, 2020; SEIDL, 2020).

Existem outras opções terapêuticas que visam à erradicação completa dos tumores de bexiga, como a baseada na instilação intravesical do *Bacilo Calmette Guérin*-BCG (cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*). Considerado padrão para o tratamento contra câncer de bexiga, atua por meio da indução da reação imune local que promove a eliminação das células neoplásicas. No entanto, o tratamento apresenta eficácia apenas para aproximadamente 40% dos pacientes (SEIDL, 2020), sendo que ainda 1% dos pacientes podem apresentar sepse grave e necessitar do uso de antibióticos e a interrupção imediata do tratamento (LENIS; LEC; CHAMIE, 2020; SANLI et al., 2017).

Outras abordagens terapêuticas em estudo incluem: direcionamento de RNAs longos não codificantes (lncRNAs) (FLIPPOT et al., 2019), micro RNAs (miRNAs) (DRAYTON et al., 2014), inibidores de piruvato-quinase (por inibir glicólise aeróbica) (LIBERTI; LOCASALE, 2016), inibidores de PARP-1 (envolvido no reparo de quebras de DNA) (GRIVAS; YU, 2019), terapia fotodinâmica e a utilização de nanopartículas entre outras.

As neoplasias malignas de bexiga, assim como outras originadas a partir dos tecidos de revestimento, apresentam a vantagem de serem acessíveis à aplicação tópica de compostos por via intravesical. Neste sentido, a utilização de tratamentos baseados na instilação por Nanopartículas (NPs), abre uma nova perspectiva terapêutica à medida que poderia ser empregada como coadjuvante ou até substituta das terapias existentes. Mas para isso, o desenvolvimento de NPs com toxicidade seletiva contra células neoplásicas malignas é uma necessidade premente.

Em função das reações químicas e catalíticas que ocorrem envolta da área superficial, as NPs (0,1 a 100 nm) possuem maior área de superfície por unidade de massa (LANONE; BOCZKOWSKI, 2006; MANSOORI; SOELAIMAN, 2005) e são mais reativas em relação aos compostos em escala natural. Em sistemas biológicos, as NPs têm demonstrado que seu pequeno tamanho, na maioria das vezes, pode ser endocitado pelo sistema celular de forma eficaz, o qual

pode ser um fator de grande importância terapêutica e diagnóstica (LANONE; BOCZKOWSKI, 2006).

No caso do microambiente tumoral, os vasos sanguíneos apresentam particularidades que favorecem a atuação das NPs tais como abundância de fosfolipídios, proteoglicanas, junções das células endoteliais anormais que produzem aberturas maiores (>100 nm) que os vasos normais (2 nm) e que facilita o acúmulo de NPs no interior do tumor. Nesse sentido, a utilização de NPs apresenta uma grande vantagem devido a sua ação menos invasiva para diagnósticos e tratamentos de neoplasias.

Várias classes de NPs estão em investigação quanto a sua utilização na terapia do câncer, tais como: (I) dendrímeros, os quais possuem grande área superficial para encapsulamento de agentes terapêuticos (DUNCAN; IZZO, 2005); (II) polímeros, que são utilizados como plataformas de distribuição direcionada de agentes antitumorais (YALLAPU et al., 2010); (III) lipossomas, que são compostos formados por fosfolipídeos naturais utilizados como carreadores tanto de fármacos hidrofóbicos quanto hidrofílicos (JEONG et al., 2009; MALAM; LOIZIDOU; SEIFALIAN, 2009); (IV) metais, que são agentes polivalentes e, de acordo com as propriedades de sua superfície, oferecem inúmeras abordagens terapêuticas (SHARMA; GOYAL; RATH, 2018).

No contexto apresentado, a utilização de Nanopartículas para tratamento do Câncer de Bexiga apresenta-se como uma ferramenta de grande potencial terapêutico em função das propriedades e da possibilidade de acesso ao interior do compartimento urinário. Deste modo, nesta Tese de Doutorado visamos o analisar algumas Nanopartículas com potencial para o tratamento do Câncer de Bexiga, bem como caracterizar mecanismos de ação envolvidos na atividade antitumoral.



## 1.2.REVISÃO DA LITERATURA

### 1.2.1. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

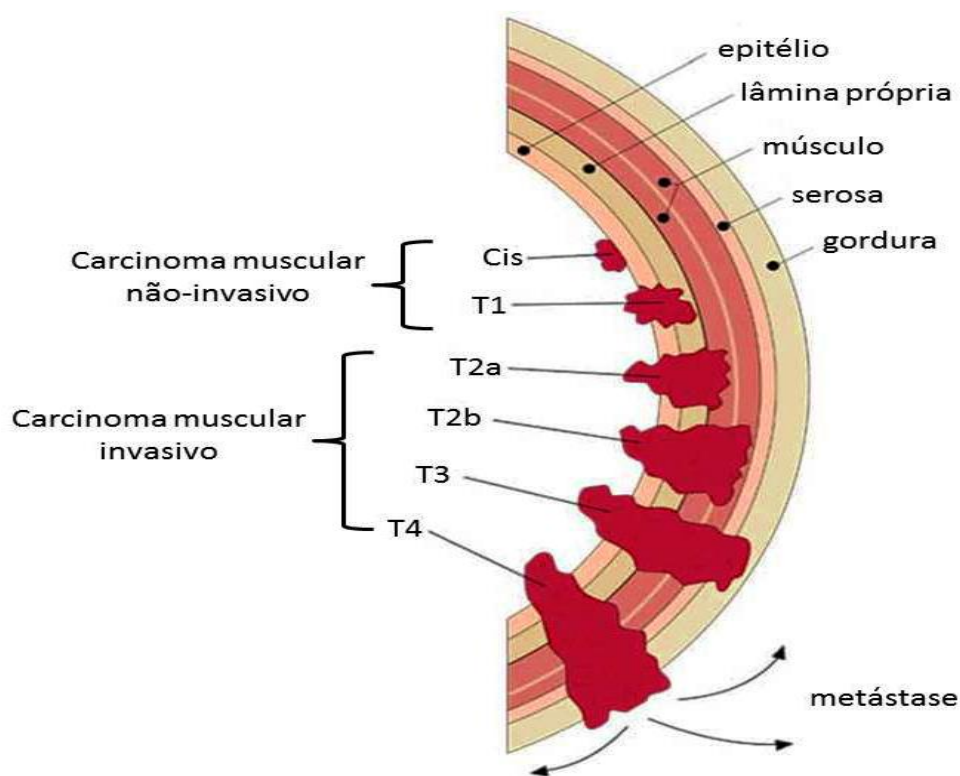
De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer de bexiga foi catalogado como o décimo tipo de câncer mais frequentemente no mundo em 2020, com aproximadamente 573.000 novos casos e 213.000 mortes (SUNG et al., 2021), sendo a taxa de incidência mundial (100.000 pessoas/ano) de 9,5 para homens e 3,3 para mulheres, e a taxa de mortalidade (100.000 pessoas/ano) de 3,3 para homens e de 0,86 para mulheres (SANLI et al., 2017). Ainda segundo os últimos dados das Nações Unidas, são esperados um aumento no número de diagnósticos de câncer de bexiga, de 7,6 bilhões para 8,5 bilhões de pessoas até 2030 e passando de 9,7 bilhões até 2050 (RICHTERS; ABEN; KIEMENEY, 2020).

As taxas de incidência em ambos os sexos são mais altas nos países do Sul da Europa e América do Norte (BRAY et al., 2018; SUNG et al., 2021), embora as taxas de mortalidade tenham diminuído nos países mais desenvolvidos, devido às melhorias nos métodos terapêuticos (BABJUK et al., 2017).

Segundo dados obtidos pelo Banco de Dados do Sistema Único de Saúde Brasileiro (DATASUS), na última década, as estatísticas relacionadas ao câncer de bexiga aumentaram de 7.277 para 16.547, sendo que esse aumento poderia ser atribuído à incidência de número casos ou a melhoria do acesso aos sistemas de saúde (TIMOTEO et al., 2020).

### 1.2.2. CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE BEXIGA

Em função das características histológicas, o câncer de bexiga pode ser classificado como: carcinoma urotelial de bexiga (CUB), carcinoma de células escamosas (SCC) e adenocarcinoma. Dentre eles, CUB é o mais estudado, uma vez que representa mais de 90% de todos os casos (BURGER et al., 2013; DINNEY et al., 2004). Baseado no grau de comprometimento local, CUB pode ser subclassificado em dois grupos distintos: o carcinoma de bexiga muscular não invasivo (NMIBC), que representa de 60 a 80% dos casos, com células cancerosas localizadas na mucosa e submucosa da bexiga, e o carcinoma de bexiga muscular invasivo (MIBC), que compreende cerca de 20% dos casos (KNOWLES; HURST, 2015) com invasão de células cancerosas na camada muscular da bexiga (MILOWSKY et al., 2016). Os NMIBCs possuem baixa taxa de invasão e uma grande chance de sobrevivência do paciente. No entanto, as altas taxas de recorrência requer um monitoramento a longo prazo, uma vez que 30% dessas neoplasias tem a probabilidade de progredir e se tornar músculo invasivo (FONG et al., 2020; ZARGAR et al., 2014).



**Figura 1.** Esquema representativo da evolução e progressão do câncer de bexiga.(Cis) carcinoma *in situ*- lesão plana não invasiva com altas taxas de recorrência e progressão (NMIBC); (Ta) carcinoma papilar muscular não-invasivo (NMIBC); (T1) início da progressão de invasão tumoral da lamina própria (NMIBC); (T2a) progressão

tumoral muscular interna (MIBC); (T2b) progressão tumoral muscular externa (MIBC); (T3) início da invasão tumoral para tecidos adjacentes (MIBC); (T4) metástase. Figura adaptada de Sanli, J et. Al, 2017 (SANLI et al., 2017).

NMIBCs ainda pode ser dividido em 2 categorias: plano ou papilar. Neoplasias uroteliais planas podem exibir um amplo espectro de modificações pré-neoplásicas fracamente malignas desprovidas de estruturas papilares. Essas displasias apresentam perda do arranjo perpendicular das células uroteliais, com grau mínimo de alargamento nuclear e irregularidade na ausência de inflamação (MILORD; LECKSELL; EPSTEIN, 2001). Neoplasias uroteliais papilares não invasivas são representados por neoplasia papilar urotelial de baixo potencial maligno, e carcinoma urotelial papilar de baixo e alto grau (DINNEY et al., 2004). No caso do carcinoma do tipo MIBC, são originados a partir de lesões não papilares, como a displasia grave ou carcinoma *in situ* (CIS) e são conhecidos pelo risco de sobrevivência dos pacientes de apenas 50% após 5 anos da ocorrência da doença e com risco de progressão para metástases (KNOWLES; HURST, 2015).

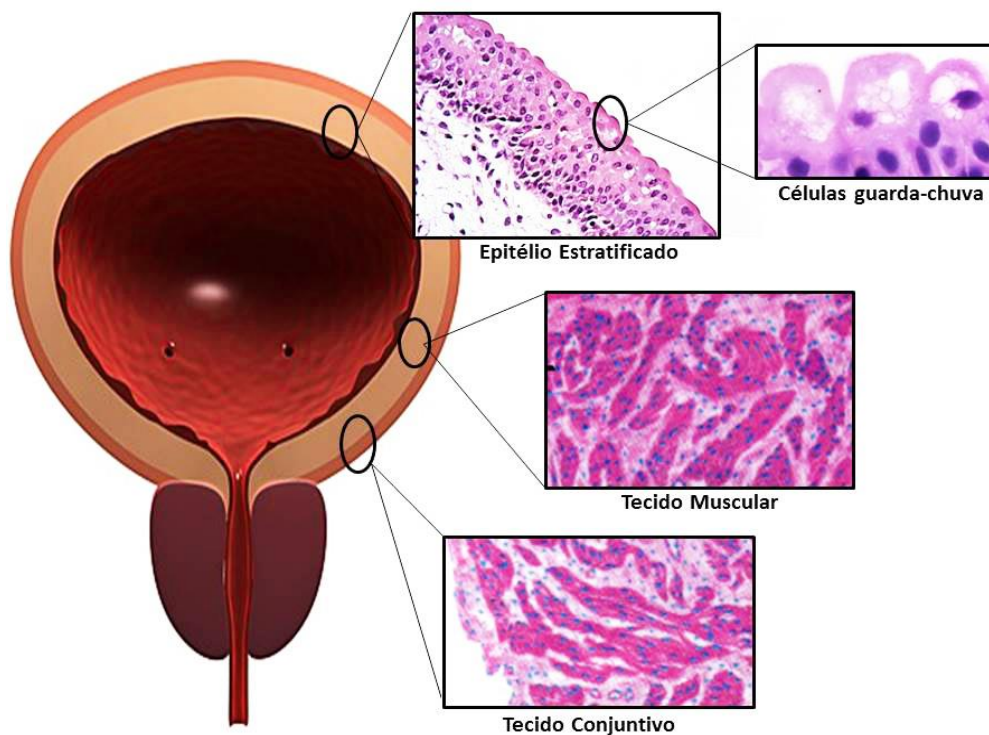
### 1.2.3. ETIOPATOGENIA

A bexiga é o principal órgão do sistema urinário, formada por tecido epitelial (urotélío) e revestido por tecido conjuntivo e muscular (ORABI et al., 2013). Esse sistema tem a capacidade de armazenar urina por longos períodos sem permitir com que moléculas como água, amônia e ureia atravessem a bexiga e se equilibrem com o sangue (T-T, 2005). A função de permeabilidade da bexiga é mantida, principalmente, por uma camada de células localizada na membrana apical do epitélio, conhecidas como células guarda-chuva (Figura 2) (KHANDELWAL; ABRAHAM; APODACA, 2009).

As células guarda-chuva são altamente diferenciadas e polarizadas com domínios distintos da membrana apical e basolateral (ACHARYA et al., 2004; LEWIS; EATON; DIAMOND, 1976) e sua morfologia depende do estado de enchimento (alongadas e escamosas) ou esvaziamento da bexiga (cuboides) (CHEN et al., 2002; HICKS, 1975; KHANDELWAL; ABRAHAM; APODACA, 2009). Uma de suas principais características é a composição de sua membrana plasmática, formada por placas e regiões articuladas intermediárias (LIANG et al., 1999) ricas em colesterol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e cerebrosídeo (KHANDELWAL; ABRAHAM; APODACA, 2009), que funcionam em conjunto para aumentar a permeabilidade urotelial; e as junções estreitas que restringem o movimento de íons,

como Na, K e Cl de acordo com o enchimento e esvaziamento da bexiga (LAVELLE et al., 2002; NEGRETE et al., 1996). Dessa forma, modificações morfológicas ou funcionais nessa camada celular, são de grande relevância para o desenvolvimento do tumor de bexiga (Figura 2) (VESSELLA; PANTEL; MOHLA, 2007).

Dados anteriores sugerem que a matriz extracelular (ECM) possui papel importante no surgimento do carcinoma, uma vez que alterações de sua composição podem causar o desequilíbrio homeostático do urotélio e dar início ao desenvolvimento e progressão tumoral (ALFANO et al., 2016; LU; WEAVER; WERB, 2012). A microbiota também possui papel nas modificações do ambiente extracelular que está em contato com o epitélio (VOLLMER et al., 1996), uma vez que proteases, collagenases, elastases e hialuronidases (BERKA; GRAY; VASIL, 1981) produzidas por bactérias agem na degradação, evasão e destruição de barreiras físicas do tecido e, conseqüentemente impulsionam a recorrência e disseminação de células tumorais de bexiga (BERKA; GRAY; VASIL, 1981).



**Figura 2.** Bexiga urinária. Esquema representativo das camadas que compõe a cavidade da bexiga. Epitélio estratificado com a extremidade composta pelas células guarda-chuva, responsável pela manutenção da permeabilidade do sistema urinário; tecido muscular detrusor e tecido conjuntivo, responsáveis pelos movimentos de eliminação dos descartes da urina. Figura adaptada de: Atlas de Histologia. Michael Roos, 2012.

Os fatores de risco associados à etiologia do câncer de bexiga podem ser divididos em categorias intrínsecas e extrínsecas. Dos principais fatores intrínsecos, o gênero, idade e predisposição genética são os mais incidentes. Dados indicam que o câncer de bexiga acomete, majoritariamente o sexo masculino, na proporção de 3:1 em relação ao sexo feminino (ANTONI et al., 2017; FERLAY et al., 2015). Isso pode ser devido às diferenças anatômicas, hormônios sexuais e hábitos de vida (YUESHENG, 2014). A faixa etária também é um dos agravantes para a doença, sendo que o avanço da idade e considerando o gênero do paciente, o risco de desenvolvimento do carcinoma urotelial também aumenta (MADEB; MESSING, 2004; SHARIAT; MILOWSKY; DROLLER, 2009). Estudos genômicos têm demonstrado possíveis mutações em diferentes genes e cromossomos que podem estar associados ao aumento do risco de desenvolver o carcinoma urotelial (BURGER et al., 2013). Apesar de serem importantes na etiologia do câncer de bexiga, os fatores genéticos não causam o desenvolvimento do câncer diretamente, mas torna o indivíduo mais susceptível a ação dos agentes carcinogênicos externos (KNOWLES; HURST, 2015).

O tabagismo é o principal fator extrínseco de CUB. Considerando que muitos compostos presentes nos cigarros, como aminas aromáticas, são capazes de gerar quebra da dupla fita e modificação em bases do DNA (BABJUK, 2017) e que estes são excretados e mantem contato direto com todo o sistema urinário (CUMBERBATCH MG, ROTA M, CATTO JW, 2016; STERN et al., 2009). Os fumantes ativos apresentam cerca de 2,5 vezes mais chances de desenvolver o carcinoma em relação aos não fumantes (ANTONI et al., 2017; BRAY et al., 2018). Estudos anteriores revelam que, aproximadamente, um em cada quatro casos de câncer de bexiga no sexo feminino e, um em cada dois casos para o sexo masculino, são causados pelo vício (SUNG et al., 2021; VAN OSCH et al., 2016). Outros fatores desencadeantes para o câncer de bexiga é a exposição a agentes como hidrocarbonetos aromáticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) e metais pesados, os quais, nos países com maior desenvolvimento industrial já foram associados com o aumento da probabilidade do desenvolvimento do carcinoma (GEORGE et al., 2018; WITJES et al., 2020)

#### 1.2.4. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO CÂNCER DE BEXIGA

O principal sinal correlacionado ao câncer de bexiga é a presença de hematúria ou sangue na urina, podendo ser identificada microscópica ou macroscopicamente (SCHMIDT-HANSEN; BERENDSE; HAMILTON, 2015). Desconforto ao urinar, infecções do trato urinário, micção repentina, dores abdominais e perda de peso constante, também são sinais que compõe o quadro clínico sugestivo da doença (KIRKALI et al., 2005; LEIBOVITCH et al., 1993).

O diagnóstico pode ser realizado a partir de informações obtidas por: (I) cistoscopia, a qual confirma a presença de alterações morfológicas ou lesões associadas com as anormalidades na mucosa; (II) ressecção transuretral do tumor de bexiga (TURBT), para remover as lesões visíveis e possibilitar análises histológicas, as quais permitem identificar como o grau de desenvolvimento do tumor, invasão, localização, aparência e comprometimento muscular e; (III) por urografia por tomografia computadorizada, que permite visualizar a existência de metástase (BABJUK et al., 2019; MATULEWICZ; STEINBERG, 2020). Estas ferramentas de análises e diagnósticos são importantes para determinar o prognóstico e o possível tratamento a partir do conhecimento sobre o grau de desenvolvimento e de invasão tecidual (WITJES et al., 2020).

O tratamento mais comumente utilizado para tumores não invasivos é a ressecção transuretral das lesões neoplásicas, impedindo a invasão do revestimento muscular da bexiga (SYLVESTER; OOSTERLINCK; VAN DER MEIJDEN, 2004; WU; WONG; KWOK, 2020). Além disso, frequentemente é recomendado tratamentos adjuvantes utilizando a terapia intravesical com quimioterápicos ou compostos imunomoduladores como o bacilo Calmette-Guérin (BCG) (BABJUK, 2017; HERR, 1999).

Atualmente, mecanismos anti-neoplásicos decorrentes da estimulação de respostas imunológicas baseado no *bacilo Calmette-Guerin* (BCG) continua sendo indicado como o tratamento intravesical (BÖHLE; JOCHAM; BOCK, 2003), uma vez que é capaz de induzir o aumento de linfócitos T citotóxicos e de mediadores inflamatórios, o que conseqüentemente, aumenta a resposta antitumoral do organismo (GALON; BRUNI, 2020). No entanto, sua utilização ainda possui algumas desvantagens, uma vez que a presença de efeitos secundários como a irritabilidade do trato urinário ou reações de hipersensibilidades são frequentes (CHEUNG et al., 2013). Além disso, alguns pacientes podem não responder ao tratamento ou existe contraindicações em função da extensão da doença. Nestes casos, a quimioterapia e

radioterapia, isoladamente ou em combinação, são recomendadas após a ressecção cirúrgica do tumor (WU; WONG; KWOK, 2020).

A quimioterapia citostática intravesical tem por objetivo a administração de drogas, tais como: mitomicina C, epirrubicina, gemcitabina ou pirarrubicina através de um cateter, diretamente na bexiga. O procedimento geralmente é realizado dentro de 24 horas após a ressecção do tumor. O tratamento demonstra reduzir consideravelmente a recorrência, mas tem pouco efeito sobre a progressão tumoral (SHELLEY et al., 2012; SYLVESTER et al., 2016). Por outro lado, quimioterapia sistêmica com cisplatina tem sido utilizada de forma prévia à cistectomia, para diminuir a massa tumoral. Apesar de apresentar grandes feitos citotóxicos contra as células tumorais, apresenta efeitos colaterais, como alterações vasculares e nefrotoxicidade (ALFRED WITJES et al., 2017).

As opções terapêuticas para tumores invasivos muscular são limitadas e se baseiam na cistectomia radical, acompanhada de linfadenectomia e a administração de quimioterapia sistêmica à base de cisplatina, a qual é considerada o tratamento padrão por seus resultados na melhora na sobrevida dos pacientes (SANLI et al., 2017; WITJES et al., 2020).

Em função da baixa especificidade dos compostos quimioterápicos, os efeitos colaterais envolvidos com a sua ação acabam levando ao comprometimento de tecidos tais como nervos, medula óssea, mucosa, bulbo capilar, sistema imunológico entre outros, majorando a intolerância ao esquema terapêutico, além do aumento do risco de indução de novas neoplasias (MITRA; COTE, 2010).

A mortalidade por câncer de bexiga geralmente é o resultado da agressiva progressão metastática (LIU et al., 2019). A quimioterapia raramente consegue controlar a disseminação de células para nódulos linfáticos, osso, pulmão e peritônio (SHINAGARE et al., 2011), podendo levar a resultados clínicos variáveis. Neste sentido, a urgência pela busca de compostos mais efetivos é uma necessidade atual.

### 1.2.5. BARREIRAS TERAPEUTICAS

Tumores sólidos possuem várias características que os distinguem de tecidos normais, os quais favorecem não apenas seu desenvolvimento, mas também a resistência às principais terapias existentes (VAUPEL, 2004) (TANNOCK, 2001).

Nos tecidos normais o sistema vascular possui uma rede ordenada de vasos sanguíneos para atender as demandas metabólicas, assim como os vasos linfáticos para drenar fluidos e subprodutos celulares do interstício (SIEMANN, 2011). Já em tumores sólidos esse equilíbrio é perturbado, caracterizado por vasos mal organizados e irregulares (SØRENSEN; HORSMAN, 2020). A principal causa desta teia caótica é a liberação de fatores como: fator de crescimento tumoral-  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ), fator de crescimento derivado de plaquetas-  $\beta$  (PDGF-  $\beta$ ) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (MEANEY; RHEBERGEN; KOHANDEL, 2020). Como consequência dessa rede ineficiente, o sangue pode se acumular nos tecidos e aumentar a pressão do fluido intersticial, impedindo a difusão de oxigênio e nutrientes para algumas regiões do tumor (MEANEY; RHEBERGEN; KOHANDEL, 2020; MUNN; JAIN, 2019), produzindo uma condição denominada como hipóxia (MCKEOWN, 2014).

A resposta à hipóxia permite que as células tumorais se aclimatizem e sobrevivam ao ambiente perturbado (AL TAMEEMI et al., 2019; MCKEOWN, 2014). Particularmente, essa característica resulta na atuação deficiente das drogas anticânceres (CODONY; TAVASSOLI, 2021; VASAN; BASELGA; HYMAN, 2019), uma vez que muitos agentes quimioterápicos, como por exemplo: carmustina e agentes alquilantes exibem citotoxicidade reduzida para células tumorais em baixa concentração de oxigênio (MINASSIAN et al., 2019). A hipóxia também é conhecida por perturbar a taxa de divisão e parada do ciclo celular, diminuindo, conseqüentemente, a eficácia dos medicamentos contra células tumorais em proliferação (GREEN; FREIBERG; GIACCIA, 2001), assim como também demonstrou selecionar células resistentes à apoptose (GRAEBER et al., 1996).

Por sua vez, o baixo pH do microambiente tumoral também representa uma barreira para a entrega de muitos agentes quimioterápicos. Em ambiente extracelular ácido, as bases fracas como doxorrubicina ou mitoxantrona, permanecem em um estado carregado, inibindo seu transporte através da membrana plasmática e reduzindo sua captação por células tumorais, além de poderem ser sequestradas por endossomos ácidos, dificultando sua penetração no tecido tumoral (CAIRNS; PAPANDREOU; DENKO, 2006).



Em relação ao microambiente tumoral (TME), comumente existe um complexo ecossistema celular, o qual desempenha papel crucial na regulação, evolução (ALLINEN et al., 2004; DENARDO et al., 2009), metástase tumoral e resistência terapêutica (LIU; GUO; HUANG, 2020). Para a maioria dos tumores sólidos, suas células produzem quimiocinas durante a progressão, que atraem principalmente células imunológicas, os quais migram através dos vasos sanguíneos e invadem o TME, se diferenciando em células maduras (CONDEELIS; POLLARD, 2006).

Macrófagos são células de primeira linha de defesa que exibem vários tipos de atividades dependendo de seu estado de polarização (LOCATI; MANTOVANI; SICA, 2013; OKABE; MEDZHITOV, 2014), como por exemplo, modulação da resposta imunológica, inflamação, proliferação celular tecidual e metabolismo. Macrófagos com resposta tipo M1 são conhecidos por auxiliar a resposta imune adaptativa Th1 (ALLAVENA; MANTOVANI, 2012, ZANGANEH et al., 2016a), sendo essenciais na supressão inicial de células tumorais em crescimento (FAN et al., 2016; MOSSER; EDWARDS, 2008), através do recrutamento (ao secretar quimiocinas derivadas de tumor CXCL-9, CXCL-1- E CXCL-11) e apresentação de antígeno às células T CD8+ e células NK em TME (BISWAS; MANTOVANI, 2010). Por sua vez, células T CD8+ e células NK, altos níveis de expressão de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , assim como as quimiocinas CCL4, CCL5 e CCL23, as quais atuam na sinalização da resposta antitumoral. Além disso, o fenótipo M1 também está associado à produção de altas quantidades óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROs) e a expressão de IL-1 e IL-12 exercendo funções, principalmente antitumorais (BISWAS; MANTOVANI, 2010; MILLS, 2012).

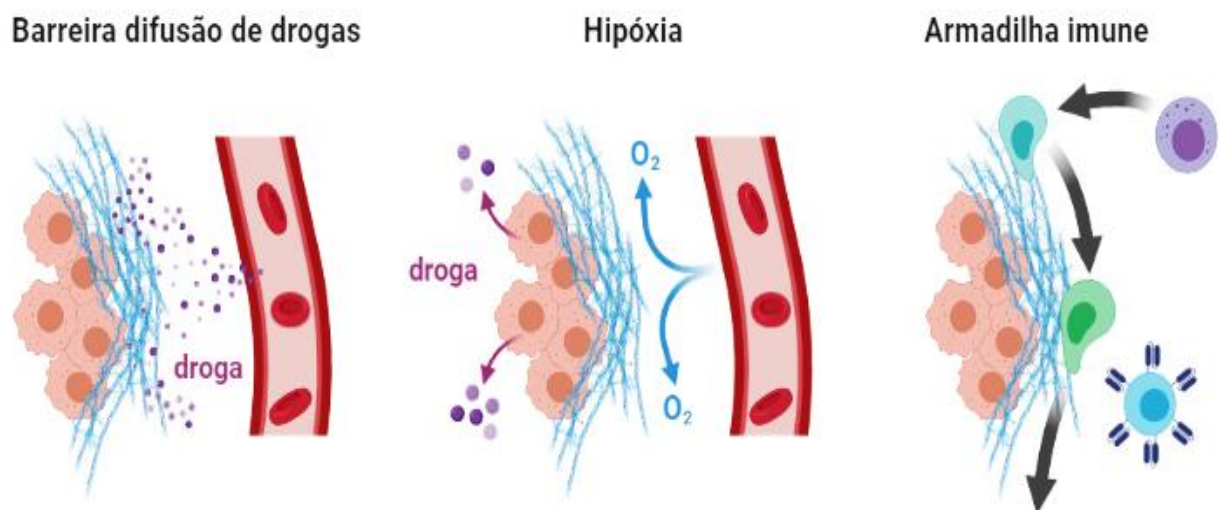
Macrófagos do tipo M2 apresentam ação anti-inflamatória, imunossupressoras, de remodelação tecidual e progressão tumoral, através de estímulos à produção de citocinas IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, VEGFs e TGF- $\beta$  e quimiocina de motivo C-C 2 (CCL2) e 5 (CCL5). Contrariamente aos macrófagos M1, os M2 não metabolizam arginina em NO, mas sim em ornitina e poliaminas, que são necessárias para a síntese de colágeno, sendo este, importante para proliferação celular e metástase tumoral (HAO et al., 2012; HEUSINKVELD et al., 2011).

A polarização de M2 desencadeia a síntese uma série de componentes importantes para a sobrevivência do tumor, como por exemplo, a secreção de fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF-A) que auxiliam no aumento da formação de vasos sanguíneos necessários para a nutrição desse tecido (LIN et al., 2015), metaloproteinase-9 de matriz (MMP-9), serina proteases e catepsinas que podem degradar a matriz extracelular (ECM) facilitando invasão

tumoral para órgãos adjacentes e promover o processo metastático (GRIVENNIKOV et al., 2012; KONG et al., 2016), além de regular positivamente a expressão de receptores MHC de células mieloides (MDSC), o qual regula a resposta imunológica mediadas por células T (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010; SCHULZ et al., 2019) os ataques antitumorais (PRENEN; MAZZONE, 2019; ZHU et al., 2017).

Frequentemente encontrados em TME, os macrófagos associados ao tumor (TAM) são equiparados aos macrófagos M2. Durante o desenvolvimento das células malignas, TAMs liberam principalmente IL-6 e IL-10, que ativam o transdutor de sinal e o ativador da transcrição 3 (STAT3) e, conseqüentemente, as vias do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), causando inibição da morte celular por apoptose e aumento da progressão do ciclo celular (YANG; GUO; HUANG, 2020).

Nos últimos anos, as pesquisas de relacionadas com os TAMs têm se concentrado nos seguintes aspectos: supressão do recrutamento de macrófagos, repolarização do tipo M2 ao fenótipo M1, inibição do crescimento tumoral em consequência da polarização M1 e inibição da sobrevivência de TAM (REICHEL; TRIPATHI; PEREZ, 2019). No entanto, a coexistência de macrófagos dos subtipos M1 e M2 em várias fases do desenvolvimento tumoral, limita significativamente a ação dos agentes terapêuticos.

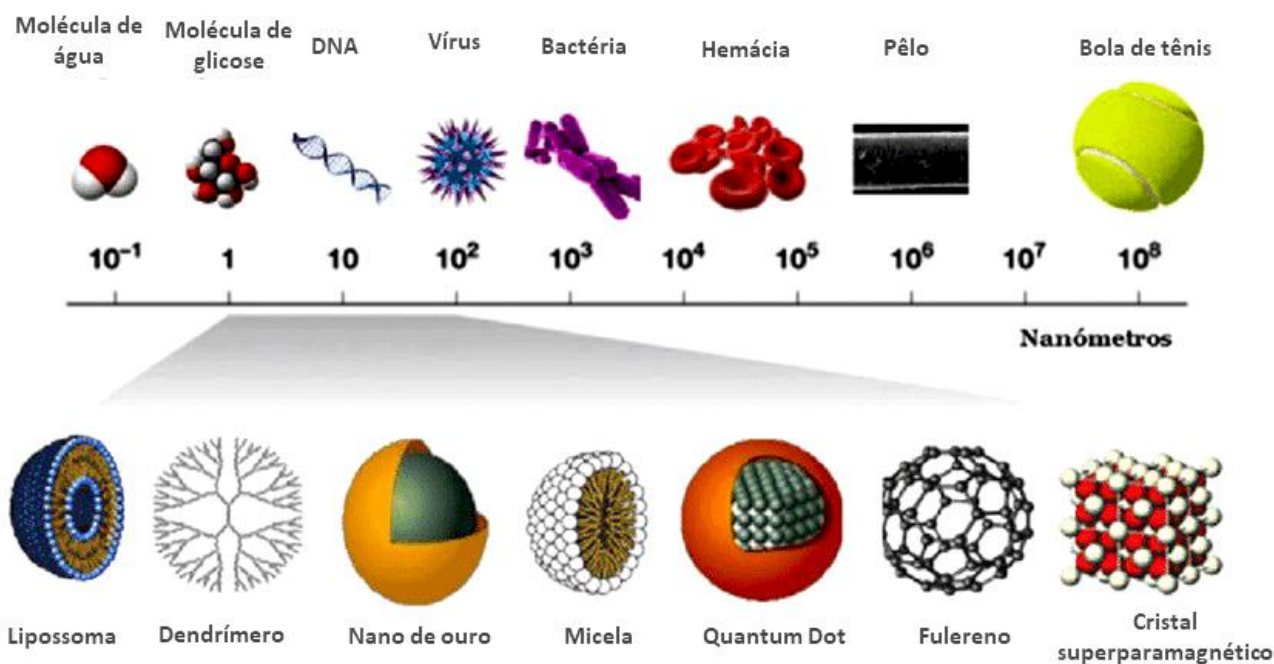


**Figura 3.** Esquematização das barreiras terapêuticas contra câncer de bexiga. (A) Desordem no sistema vascular impedindo a difusão equilibrada das drogas sobre as células tumorais; (B) Baixa concentração de O<sub>2</sub> no tecido tumoral impede a ação efetiva de agentes antitumorais específicos ao tratamento; (C) Resposta imunológica e a polarização de TAM em função do desenvolvimento tumoral. Figura produzida com auxílio de BioRender.

### 1.2.6. NANOTECNOLOGIA

Nanotecnologia é a ciência que estuda o desenvolvimento de materiais com tamanhos nanométricos, referidos como nanopartículas (NPs) (FERRARI, 2005; NIKALJE, 2015), que oferecem respostas distintas quando comparado com o mesmo material em maior dimensão, expostos à determinados estímulos (DUSCHL, 2016; PARAMASIVAM et al., 2017). Devido às NPs possuírem maior área superficial, variando de 0.1 a 100 nm em pelo menos um de sua dimensão (LANONE; BOCZKOWSKI, 2006), esta característica permite com que sejam mais reativas (MISSAOUI; ARNOLD; CUMMINGS, 2018), uma vez que a concentração de átomos em sua superfície representa 90% de sua massa total (RAMOS, 2017).

Nas últimas décadas, as NPs vêm sendo investigadas quanto sua utilização na área da saúde, uma vez que a partir de modificações em sua superfície por métodos químicos e físicos, podem apresentar a capacidade de estabelecer interações biológicas importantes, assim como: anticorpo-antígeno; receptor-ligante; DNA-DNA (CASTNER; RATNER, 2002; MCNAMARA et al., 2010; MOYANO; ROTELLO, 2011; YIM et al., 2010) para fornecer ferramentas mais eficientes para tratar doenças com alto grau de morbidade e mortalidade, como o câncer (CHOW; HO, 2013). Com isso, atualmente a utilização de NP tem permitido abordagens médicas até antes não atendidas, como: (i) maximização da eficácia e redução da dose e a toxicidade; (ii) direcionamento de drogas, liberação controlada e específica no local, favorecendo a distribuição preferencial no tecido de ação; (iii) exploração de múltiplos mecanismos de moléculas altamente eficazes com o mínimo de efeitos colaterais; (iv) distribuição seletiva entre os tecidos (SOARES et al., 2018; ZHANG et al., 2012).



**Figura 4:** Comparação entre nanopartículas com moléculas e materiais de tamanhos distintos, variando de  $10^{-1}$  a  $10^8$  nm. Figura adaptada de ESTUDIOS DE LA INTERACCIÓN PÉPTIDO-DENDRÍMERO A TRAVÉS DE SIMULACIONES COMPUTACIONALES.

Apesar de NPs apresentar características promissoras, seu grau de toxicidade em células e tecidos depende de vários parâmetros. À medida que o tamanho e a forma diminuem, a razão entre área de superfície/volume aumenta, o que pode aumentar seu poder citotóxico e potencial anticancerígeno (JOHNSTON et al., 2010), uma vez que o número de átomos presente em sua superfície é maior e pode resultar no aumento de interação com os componentes celulares (GRATTON et al., 2008; KIM; RYU, 2013; MORSY et al., 2021; ONLINE, 2013). Além disso, NP muito pequenas são mais propensas a serem interiorizadas para as células e provocar danos irreversíveis (EGBUNA et al., 2021; ELDER et al., 2008).

Também, como já demonstrado em estudos anteriores, a estrutura cristalina pode afetar diretamente a toxicidade de NPs. Assim, materiais polimorfos com estrutura química semelhante pode apresentar propriedades que os diferem, resultando em mecanismos de toxicidade distintos (HUANG et al., 2016; MARTÍNEZ et al., 2020). Além disso, a funcionalidade da superfície é uma característica importante que pode alterar o grau de toxicidade de NPs, uma vez que os revestimentos podem ser utilizados para melhorar a sua

estabilidade, mobilidade e dissolução no meio a qual estão inseridas, podendo modificar sua ação tóxica ao tecido alvo (MALVINDI et al., 2014).

Por fim, a carga superficial pode ter efeito na interação com componentes celulares, influenciando diretamente no seu poder citotóxico (NIKALJE, 2015). A carga superficial de uma NP é comumente caracterizada através do potencial zeta (ELSAESSER; HOWARD, 2012; FRANCIS; DEVASENA, 2018; PARK et al., 2003) (GARCÉS et al., 2021). Assim, NPs carregadas positivamente podem transitar facilmente através das membranas celulares por sua capacidade de adsorção de proteínas (interação conhecida como formação de “proteína corona”) (CHELLAT et al., 2005; EL BADAWY et al., 2011; PINO et al., 2014). Essas interações podem modificar a identidade físico-química das NPs e influenciar seu comportamento biológico, como captação de células neoplásicas, tempo de vida de circulação no sangue e sua toxicidade (PHOGAT; KOHL; UDDIN, 2018).

#### 1.2.7. NANOTECNOLOGIA NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE BEXIGA

Como já mencionado anteriormente, uma das principais características do câncer de bexiga é o seu microambiente hipóxico, devido às oclusões vasculares (parcial ou total), onde a circulação sanguínea é limitada. Essa característica está associada à parada da replicação e reparo do DNA, permitindo o acúmulo de erros e a instabilidade genômica (PIRES et al., 2012), proporcionando a progressão da doença, disseminação, metástase e resistência às terapias (BROWN, 2000; HARRIS; RADCLIFFE, 2002). Há evidências de que pacientes com menores disponibilidades de oxigênio no tecido tumoral apresentam o pior prognóstico da doença (JIANG et al., 2021).

A nanotecnologia tem se mostrado uma ferramenta importante para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer de bexiga (BUSS et al., 2018; OLIVEIRA; VILLA NOVA; BRUSCHI, 2018). Os efeitos citotóxicos de NPs provocados em células tumorais podem incluir, principalmente, a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) provocando alterações da integridade da membrana celular e disfunções celulares (YOSHIDA et al., 2015).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes (SCHAEUBLIN et al., 2011). Dentre as EROs, inclui-se: o ânion superóxido

(O<sub>2</sub>'<sup>2</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radical hidroxila (HO\*), radical peroxila (ROO), oxigênio singlete (O<sub>2</sub>'<sup>-</sup>) e também peróxidos orgânicos (ROOH) e peroxinitrito (ONOO) (BIAZAR et al., 2011). O sistema antioxidante é representador por um complexo de enzimas, tais como: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona, as quais mantêm os níveis de EROs em patamares fisiológicos.

Em muitos casos, os efeitos tóxicos de NPs induzidos por altas concentrações de EROs desencadeiam a morte celular apoptótica pela ativação de vias intrínsecas (mitocondrial) e/ou extrínsecas (citoplasmática), o qual regula a expressão de proteínas, tais como a família da Bcl-2 (Bax/Bcl-2), liberando o citocromo C de mitocondriais para o citosol ou ativando a cascata da caspase-3. Os sinais que são produzidos em resposta a estes estímulos, liberam moléculas pró-apoptóticas que desencadeiam a produção do complexo proteico conhecido como apoptossoma, que induz a conversão da pró-caspase 3 em caspase-3, culminando com os eventos finais da morte celular (DE STEFANO; CARNUCCIO; MAIURI, 2012).

A indução de genotoxicidade por meio da quebra de DNA também acontece com a exposição à algumas NPs, as quais têm capacidade de levar à morte celular por indução de disfunção autofágica produzida por mecanismos que levam a sobrecarga ou inibição da atividade lisossomal, interferência do tráfico de organelas mediado pelo citoesqueleto e a quebra da estabilidade lisossômica (estresse oxidativo, alcalinização, edema osmótico, rompimento de membrana). E finalmente, também já foi descrito que NPs podem induzir morte celular por piroptose por induzir a formação do complexo proteico conhecido por inflamassoma, que medeia a produção do pirógeno IL-1β, o qual estimula o desenvolvimento de um processo inflamatório agudo (STEFANO; CARNUCCIO; MAIURI, 2012). (BAYDA et al., 2020; KAGAN; BAYIR; SHVEDOVA, 2005).

Pensando nisso, diversos tipos de modalidades terapêuticas antitumorais empregando NP vêm sendo estudadas para o câncer de bexiga, como destacado:

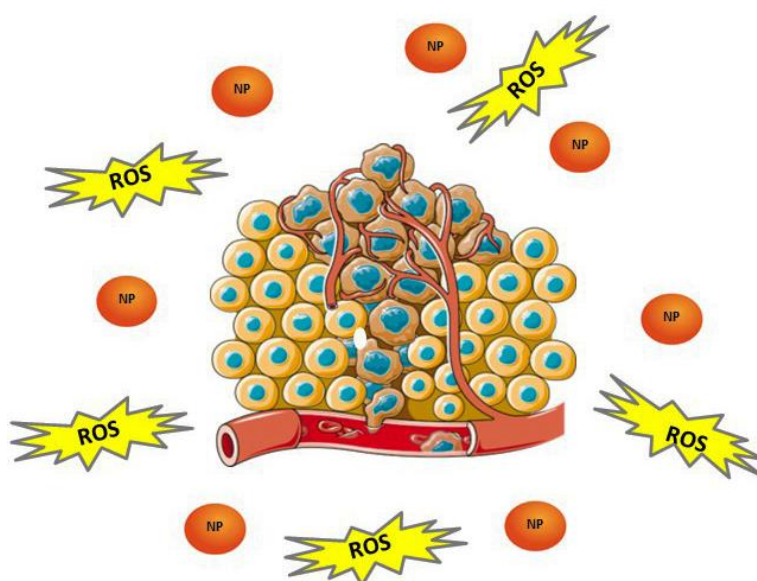
#### 1.2.7.1. UTILIZAÇÃO DE NP IN SITU

A primeira linha de utilização de NPs para o tratamento antineoplásico a ser destacado é a sua utilização diretamente no tecido tumoral (*in situ*) (DAEI et al., 2021). Isso porque a capacidade de acumular NPs no tumor é muito maior em relação aos tecidos normais, uma vez que a abertura dos vasos possibilita seu trânsito para interior do tecido alvo e aumenta, portanto,

a seletividade do tratamento (YANG et al., 2021). Estudos demonstram a capacidade de NPs em diminuir o estado hipóxico do microambiente ao penetrar no tumor (CHEN et al., 2016; IM et al., 2018; SONG et al., 2016). Essa estratégia não apenas suprime os mecanismos de desenvolvimento e progressão associados à hipóxia tumoral, como também podem aumentar a eficácia de tratamentos como quimioterapia e radioterapia, que são restringidos pela deficiência de oxigênio (YANG et al., 2021).

Metais como nanopartículas de ouro (AuNP) e prata (AgNPs), já foram relatados ter papel benéfico na terapia do câncer de bexiga. A capacidade de AuNPs para o tratamento do câncer de bexiga já foi demonstrado devido a sua alta dispersão e afinidade para a ligação em receptores específicos de CUB (PARK et al., 2019), possibilitando a modificação de estruturas biomoleculares, como proteínas e DNA, facilitando a morte celular por apoptose (KASHYAP et al., 2019; SZTANDERA; KLAJNERT-MACULEWICZ, 2019). Além disso, AuNPs podem ser utilizados na decoração de biomoléculas e ligantes para melhorar a atividade para o tratamento do câncer de bexiga (SINGH et al., 2018).

Os benefícios de AgNPs para o tratamento do câncer urotelial já foram demonstrados quanto a quebra do material genético, inibição dos processos metastáticos e morte celular por apoptose (FERREIRA et al., 2020). Isso pode ser devido à sua capacidade de liberação de prata metálica ( $Ag^0$ ) e cátions de prata ( $Ag^+$ ), que pode provocar alto grau de estresse oxidativo e, conseqüentemente danos à membrana mitocondrial, destruição da bicamada lipídica e genotoxicidade, resultando em morte celular (BARANI et al., 2021; FERREIRA et al., 2020).



**Figura5:** Esquema representativo de nanopartículas no tratamento *in situ*. Figura produzida com auxílio de BioRender.

### 1.2.7.2. UTILIZAÇÃO DE NPs NA TERAPIA FOTODINÂMICA

Dentre os tratamentos mais estudados atualmente, a terapia fotodinâmica (PDT) é um dos seguimentos menos invasivo (DOUGHERTY et al., 2015), que envolve a combinação de dois componentes atóxicos (luz e fotossensibilizador) para obter um efeito terapêutico (OCHSNER, 1997). PDT surgiu como uma alternativa para uma variedade de tipos de câncer, uma vez demonstrado seu potencial contra células neoplásicas resistentes a quimioterapia e radioterapia (TANGUTOORI et al., 2016).

O procedimento envolve um agente fotossensibilizador (PS) irradiado em um determinado comprimento de onda correspondente a banda de excitação do sensibilizador. Na presença de oxigênio, alguns eventos são capazes de provocar a morte de células tumorais, dano à microvasculatura e a indução da cascata inflamatória local (MARLENA S. et. Al., 2008). Isso é possível devido à capacidade do PS transferir a energia luminosa ao oxigênio molecular para produzir um estado fundamental eletronicamente excitado (HENDERSON; DOUGHERTY, 1992), e formar radicais livres (DOUGHERTY et al., 2015) por duas reações distintas: Na reação do tipo I, PS reage com uma molécula orgânica presente no microambiente tumoral e adquire um átomo de hidrogênio ou elétron para formar um radical. A oxidação do PS, por sua vez, produz um radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), e em seguida, a redução de um elétron de  $O_2^{\bullet-}$ , resulta em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que, conseqüentemente, pode ser reduzido a um radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) oxidante (FOOTE, 1968). Alternativamente, na reação tipo II, PS pode transferir sua energia para o oxigênio molecular e levar à formação de oxigênio singlete ( $O_2$ ) (HENDERSON; DOUGHERTY, 1992).

A resposta ao tratamento depende do tipo de PS, estado de oxigenação do tecido, tempo de exposição à luz, comprimento de onda e do tipo de célula alvo (LI, 2012). Entretanto, as extensões das respostas biológicas provocadas estão limitadas à área de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), a qual o tecido foi exposto à luz, uma vez que a alta reatividade e o tempo de meia-vida dos ROS em sistemas biológicos são de aproximadamente 0,04  $\mu$ s e o raio de ação de 0,02  $\mu$ m (MOAN; BERG, 1991).

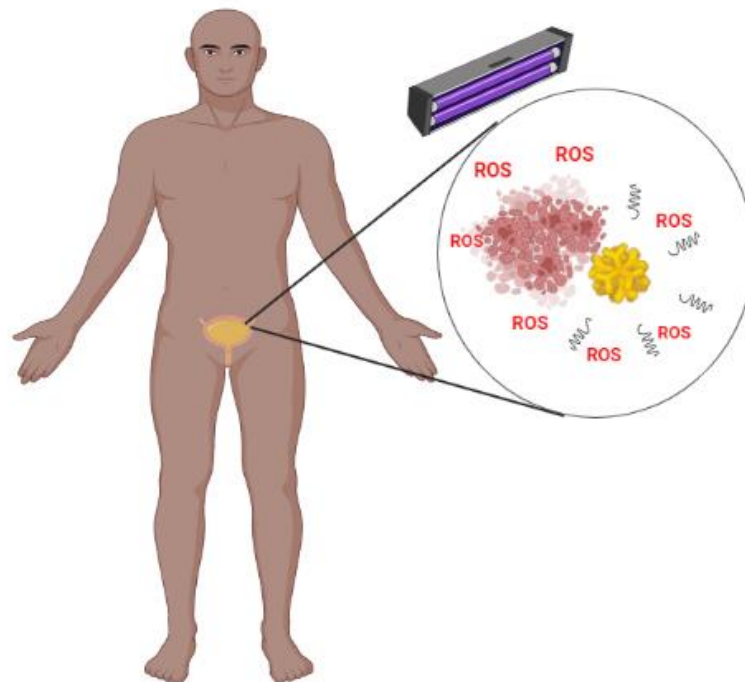
Estudos mostram que, dependendo das características de PDT, não há uma via única que leve a morte celular após a terapia (ABRAHAMSE et al., 2017). A PDT pode induzir as três principais vias de morte celular. Os efeitos tóxicos produzidos por EROs envolvem a morte celular apoptótica desencadeada pela ativação das vias mitocondriais e/ou citoplasmáticas, (TAIT; GREEN, 2010) ativando a via enzimática da família Bcl-2 (Bax / Bcl-2), liberando



citocromo C para o citosol ou a ativação direta da cascata da caspase-3. No entanto, a fototoxicidade não afeta apenas a sinalização de caspases, como também proteases e calpaínas (BUYTAERT; DEWAELE; AGOSTINIS, 2007), culminando na mudança de estratégias de morte para a modalidade necrótica (KESSEL, 2002). Por último, os danos às células também podem provocar à estimulação da macroautofagia (REINERS et al., 2010), o qual pode ser estimulada por vários sinais de estresse, incluindo o estresse oxidativo (DEWAELE; MAES; AGOSTINIS, 2010).

O desenvolvimento e a utilização de amostras de NPs podem ser úteis como fonte de O<sub>2</sub>, aumento da concentração de EROs e a estabilidade do tratamento, favorecendo a terapia fotodinâmica para o câncer de bexiga (TOMLINSON et al., 2015). As características das nanopartículas podem determinar sua localização dentro das células e definir as vias de sinalização envolvidas no processo de morte celular (LI, 2012).

Em vista do tratamento do câncer de bexiga utilizando a terapia PDT, o 5-aminolevulínico (5-ALA) tem demonstrado grandes resultados (RUZICKA, 2015). Uma de suas vantagens é o seu acúmulo em células neoplásicas iniciais, o que torna seletivo e adequado para o tratamento de câncer de bexiga não-muscular (KENNEDY, 1990; YAN et al., 2013).



**Figura 6:** Esquema representativo da Terapia Fotodinâmica utilizando nanopartículas. Figura produzida com auxílio de BioRender.

O câncer urotelial de bexiga, por ser uma das neoplasias mais comuns no mundo e apresentar grandes taxas de progressão, recorrência e mortalidade, e faz com que essa doença tenha um grande peso para o sistema de saúde público, pois seu tratamento é um dos mais dispendiosos. Diante dessa problemática, a utilização de nanopartículas como método de tratamento ao câncer de bexiga pode se tornar uma alternativa, podendo diminuir os danos adversos provocados pelos tratamentos convencionais.

### **1.3.OBJETIVOS GERAIS**

A partir das modificações provocadas nas estruturas das nanopartículas  $\text{Ag}_2\text{WO}_4$ ,  $\text{TiO}_2$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ , nesta Tese de Doutorado, visamos avaliar a funcionalidade e a citotoxicidade de três Nanopartículas para o tratamento do Câncer de Bexiga, bem como caracterizar mecanismos de ação envolvidos na atividade antitumoral.

# **CAPÍTULO 1**

**Nanopartículas de Ag/ $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> formado por Irradiação de Elétron e feixe femtosegundo como potente agente antitumoral**

## RESUMO

A capacidade de manipular a estrutura e função de sistemas promissores por meio de estímulos externos é emergindo com o desenvolvimento de materiais multifuncionais reconfiguráveis e programáveis. O aumento da atividade antitumoral requer tratamentos novos e eficazes para serem diligentemente eficazes. Neste trabalho, a síntese de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ , irradiado com elétrons ( $\text{Ag}_2\text{WO}_4\text{:E}$ ) e com feixes de laser de femtossegundos focalizado ( $\text{Ag}_2\text{WO}_4\text{:F}$ ) e não focalizado ( $\text{Ag}_2\text{WO}_4\text{:NF}$ ) e a capacidade citotóxica contra células tumorais de bexiga foram estudados. Utilizamos as linhagens celulares MB49 (tumoral) e BALB/3T3 (não tumoral) para quantificar a produção de EROs intracelular e identificar os processos de morte celular provocado pela exposição às nanopartículas de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ . Verificamos que, a nucleação e o crescimento de AgNP na superfície de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$  apresentou maior seletividade contra as células cancerosas em relação à amostra não irradiada, erradicando assim as populações de células cancerosas por necrose e apoptose, sem afetar a viabilidade das células saudáveis.

## **ABSTRACT**

The ability to manipulate the structure and function of promising systems through external stimuli is emerging with the development of reconfigurable and programable multifunctional materials. The increase in antitumor activity requires new and effective treatments to be diligently effective. In this work, the synthesis of  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, irradiated with electrons (Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:E) and with focused (Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:F) and unfocused (Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:NF) femtosecond laser beams, and the cytotoxic capacity against bladder tumor cells were studied. We used MB49 (tumor cell) and BALB/3T3 (non-tumor cell) to quantify intracellular ROS production and, in turn, identify cell death processes caused by exposure to  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> nanoparticles. We found that the nucleation and growth of AgNP on the surface of  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> showed greater selectivity against cancer cells compared to the non-irradiated sample, thus eradicating cancer cell populations by necrosis and apoptosis, without affecting the viability of healthy cell.

## 2.1.INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a utilização de nanopartículas tem atraído pesquisadores para uma gama de estudos para o desenvolvimento de novos materiais com ampla aplicação tecnológica, principalmente relacionada à área da saúde (ASSIS et al., 2018).

A utilização de prata e íons prata na medicina não é novidade e seu uso é relatado desde o século oito (JAIN et al., 2009; KALISHWARALAL et al., 2010; XU et al., 2020). Nanopartículas de prata (AgNPs), são consideradas um dos membros mais importantes da família dos metais nobres (DONG et al., 2014; XIA et al., 2009; YANG et al., 2008), e representa um grande candidato ao desenvolvimento de novos nanomateriais com diversas aplicações (PREMKUMAR et al., 2018). Seu uso foi destacado com sucesso principalmente em sistemas de purificação de água (PRADHAN; PAL; PAL, 2001; SAHA et al., 2010; SIGNORI et al., 2010), desenvolvimento de produtos de consumo, tais como cosméticos, tintas, detergentes para a roupa, brinquedos, acessórios e uma variedade de aplicações domésticas (LI et al., 2008; TOLAYMAT et al., 2010) e fabricação de dispositivos tecnológicos (MITRANO et al., 2014).

Além disso, o uso de AgNPs foi destacado com sucesso para o desenvolvimento de curativos para queimaduras, uma vez que apresentam efeitos antibacterianos e anti-inflamatório aprimorados (GHERASIM; FICAI; ANDRONESCU, 2018; HINOJOS-MÁRQUEZ et al., 2016), assim como propriedades antivirais (MAILLARD; HARTEMANN, 2013; XIANG et al., 2013), atividade antifúngica (KVITEK et al., 2009) e leveduras (KIM et al., 2007; WODKA et al., 2010; XIU et al., 2012). O uso de AgNPs também é relatado como agente antitumoral promissor. Estudos anteriores demonstram que sua atividade terapêutica está relacionada de acordo com seu tamanho, forma e dose/concentração (JOURNAL et al., 2018; KOVÁCS et al., 2016; YUAN; PENG; GURUNATHAN, 2017; ZIELINSKA; ZAUSZKIEWICZ-PAWLAK; WOJCIK, 2018), além dos fatores relacionados ao microambiente tumoral, tais como pH da lesão, oxigenação tecidual e linhagem celular (TAVAKOLI et al., 2018; YUAN; PENG; GURUNATHAN, 2017).

Contudo, vários compostos de prata tem sido desenvolvidos e empregados em diferentes áreas (SANTOS et al., 2020). Dentre eles, o tungstato de prata ( $\text{Ag}_2\text{WO}_4$ ) tem atraído à atenção nos últimos anos devido as suas propriedades físico-químicas que permitem uma ampla gama de aplicações (FOGGI et al., 2017). O  $\text{Ag}_2\text{WO}_4$  é um material cerâmico que apresenta polimorfismo cristalino estrutural, a qual a fase  $\alpha$  ( $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ ) é termodinamicamente mais

estável (HARO CHÁVEZ et al., 2018; LIN et al., 2015). Além disso, é considerado como um semicondutor do tipo n (ANDRÉS et al., 2014; CAVALCANTE et al., 2012) e tem sido amplamente explorado por suas atividades como degradação de corantes orgânicos e compostos aromáticos (CHEN; XU, 2014; LIN et al., 2015; ZHANG et al., 2015), bem como detecção de ozônio e gás acetona (DA SILVA et al., 2014, 2016).

As propriedades biológicas de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> tem sido exploradas principalmente como agentes antimicrobianos e antitumorais (FOGGI et al., 2017; LONGO et al., 2014; ROCA et al., 2015). Sua utilização esta principalmente relacionado à capacidade de produzir EROs, uma vez que o arranjo de átomos em sua estrutura de microcristais estão conectados por interações energeticamente instáveis e podem criar distorções entre as ligações Ag-O-W-O (ANDRÉS et al., 2014; CAVALCANTE et al., 2012) e, conseqüentemente produzir radicais oxidantes, como OH\* e H<sub>2</sub>O\* (HARO CHÁVEZ et al., 2018).

A utilização de nanopartículas compostas por um metal semicondutor e NPs depositadas em sua superfície, tem demonstrado grande potencial para superar limitações relacionadas à resistência aos tratamentos do câncer (BOTTARO, LARSEN, 2008; VIVERO-ESCOTO; HUANG, 2011). Isso porque esse sistema pode melhorar as características relacionadas aos efeitos de ressonância plasmônica (CLAVERO, 2014; KNIGHT et al., 2011; ZHANG et al., 2018), o qual permite as interações específicas entre a NP modificada com células tumorais (ALVAREZ-BERRIOS et al., 2016) que no final, são usados para otimizar seus efeitos e aplicações terapêuticas (ANDRÉS et al., 2014).

A capacidade de formação de materiais híbridos deve permitir o ajuste sistemático das características benéficas de ambos materiais e otimizar suas propriedades para a terapia contra o câncer (HE; LU; LIN, 2015). O grande potencial para o crescimento de AgNPs na superfície de semicondutores, induzido por irradiação de feixe de elétrons, é bem conhecido (LI; ZHANG, 2010; MANSOURIAN et al., 2016; SHI et al., 2013). Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a exposição ao elétron ou feixe de laser femtossegundo (fs) podem dar origem a formação e processo de crescimento de AgNPs em cristais de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> (ANDRÉS et al., 2014, 2018; LONGO et al., 2013) com uma ampla gama de aplicações, incluindo antimicrobiana (DE FOGGI et al., 2017). Levando em consideração sua relevância biológica mencionada, o compósito  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> foi sintetizado e irradiado por feixe de elétrons e fs e realizado um estudo sobre seus efeitos citotóxicos e atividade antitumoral.

## 2.2.OBJETIVOS

### 2.2.1. OBJETIVOS GERAIS

A partir das modificações provocadas na superfície do tungstato de prata ( $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ ) por irradiações por feixe de elétrons e laser femtossegundo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade citotóxica de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:N}$  (amostra não tratada),  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:E}$  (irradiado por elétrons),  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:NF}$  (irradiado por femtossegundo de forma não focalizada) e  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:F}$  (irradiado por femtossegundo de forma focalizada) como potenciais aplicações para tratamentos do câncer de bexiga.

### 2.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para avaliar a atividade citotóxica das amostras obtidas  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:N}$ ,  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:E}$ ,  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:NF}$  e  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:F}$ , foram realizadas as seguintes análises:

- Síntese de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$  e radiação por feixe de elétrons e laser femtossegundo (focalizado e não-focalizado);
- Análise citotóxica de células tumorais de bexiga (MB49) e não-tumorais (BALB/3T3) expostas às amostras de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$  irradiadas em diferentes concentrações;
- Quantificação da produção de EROs por amostras de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$  irradiadas;
- Mensuração de EROs total intracelular em MB49 e BALB/3T3 expostas as amostras de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$  irradiadas;
- Análise qualitativa do tipo de morte celular provocado em células MB49 e BALB/3T3 quando expostas às amostras de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$  irradiadas.



## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.2. Síntese de $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>

A síntese e irradiação de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> foi realizada pelos pesquisadores e colaboradores do Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais (CDMF), do Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC), do Departamento de Química (DQ), Universidade Federal de São Carlos- UFSCar. O método de síntese foi baseado no método de coprecipitação aquosa, como anteriormente relatado (ASSIS et al., 2018).

### 2.2.3. Irradiação de $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> por elétrons

Para irradiar o material com elétrons e obter o composto  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:E, a amostra  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> foi colocada em um microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo (SEM-FEG) usando um Supra 35-VP (Carl Zeiss, Alemanha) com uma tensão de aceleração de 15 kV por 5 min.

### 2.2.4. Irradiação $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> por Femtossegundo

Pellets  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> foram irradiados com um laser Ti: safira (Femtopower Compact Pro, Femto Lasers) usando pulsos de largura total de 30 fs (FWHM) no comprimento de onda central de 800 nm e uma taxa de repetição de 1 kHz. Para obter uma compressão de pulso mais precisa na amostra, um filtro óptico acústico programável (DAZZLER, Faslite) foi usado. Um feixe de laser de 6 mm de diâmetro e potência média de 200 mW foi focado na superfície de um alvo de pellet de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> com uma lente de 75 mm. Para obter o composto focalizado ( $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:F), o pellet  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> foi colocado no fundo de uma cubeta de quartzo anexada a um controle de movimento bidimensional, se movendo em velocidade constante de 0,45 mm/s no plano de foco perpendicular ao feixe de laser. Na posição focal, o tamanho do ponto era de aproximadamente 21  $\mu$ m com uma fluência de aproximadamente 60 J/cm<sup>2</sup>. Para o composto não-focalizado ( $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:NF), a posição do pellet foi movida 8 mm mais perto da lente convexa para obter um ponto focal de aproximadamente 84  $\mu$ m e uma fluência de aproximadamente 3,6 J/cm<sup>2</sup>. A grande diferença na fluência sobre as duas amostras é o parâmetro chave para as diferenças estruturais entre elas (CHEN; XU, 2014).

### 2.2.5. Cultura Celular

Carcinoma urotelial de bexiga murino (MB49) e fibroblastos normais murinos (BALB/3T3), foram cultivadas em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) com alta concentração de glicose e 2 mmol/L de L-glutamina (Cultilab, Campinas, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab) e 1% de penicilina + estreptomicina (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brasil) (DMEM completo) em incubadora a 37°C, com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.2.6. Viabilidade celular em exposição as amostras de $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.

Para investigar *in vitro* a toxicidade das amostras, o teste foi realizado com as linhas celulares MB49 e BALB/3T3. Ambas as linhas celulares foram semeadas em placas de cultura de 96 poços (Corning Incorporated, NY, EUA) a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço em meio DMEM completo e mantido durante o período de adesão celular. As células foram expostas a amostras  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> irradiadas nas seguintes concentrações: 4,63; 11,58; 23,16 e 46,31  $\mu\text{g/mL}$  e um controle negativo composto de células não tratadas, sendo o experimento realizado em triplicata. Após a exposição de 24 horas, as células resultantes foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X), e realizado o teste de viabilidade celular, adicionando 200  $\mu\text{L/poço}$  de Resazurina 70  $\mu\text{mol/L}$  (Sigma-Aldrich, EUA) em PBS 1X. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro com comprimentos de onda de 570 e 600 nm (BORRA et al., 2009).

### 2.2.7. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio por amostras de $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.

A mensuração da produção de EROs foi realizada a partir da degradação da rodamina B (RhB) (Aldrich 95%) sob luz ultravioleta. Para tanto, 50 mg de cada amostras de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> foram dispersas em uma solução 50 mL de RhB ( $1 \times 10^{-5}$  mol/ L) colocado em um banho ultrassônico (Branson, modelo 1510; frequência de 42 kHz) por 10 min. Esta solução foi mantida no escuro, sob agitação por 30 min para permitir o processo de adsorção-dessorção. Após este processo, a alíquota inicial foi retirada e, em seguida, as soluções foram iluminadas por quatro lâmpadas de luz visíveis (Philips TL-D, 15 W) em sistema fotocatalítico mantido a 20°C em banho termostático sob agitação. A alíquota final foi retirada após 60 min. Este

processo foi repetido para todas as amostras. As alíquotas foram centrifugadas para obter a fase líquida sozinho. As variações na banda de absorção máxima em  $\lambda = 553$  nm (RhB) foram medidas por meio de Medições de espectroscopia de absorção de UV-Vis da solução em um espectrofotômetro V-660 (JASCO). Para analisar a ação dos radicais  $\text{OH}^*$  e  $\text{O}'_2$ , realizamos testes adicionando sequestradores de espécies reativas apropriadas tal como 0,067 g de BQ (Alfa Aesar) e 0,0589 mL de álcool terc-butílico (TBA), respectivamente.

#### 2.2.8. Quantificação intracelular de espécies reativas de oxigênio

As células MB49 e BALB/3T3 semeadas em placas de parede preta de 96 poços (Corning, NY, EUA) sob as mesmas condições descritas no item 3.5, e expostas as NPs na concentração que apresentou o melhor resulta no ensaio de viabilidade celular (23,16  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). Para a medição da produção de ROS, as células foram coradas com 30  $\mu\text{L}$  de uma solução 100  $\mu\text{mol/L}$  de 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína- DCF-DA (Sigma-Aldrich, EUA) por 30 minutos e, em seguida expostas ao tratamento. Imediatamente, as células foram submetidas a uma cinética (produção de ROS /tempo) realizada por 105 min (a cada 15 min). Como controle positivo, uma solução de 1.0 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi utilizada para induzir o estresse oxidativo nas células. As leituras de fluorescência foram feitas usando Spectra Max i3 (Molecular Devices), com excitação de 485-530 nm (PARRA-ROBERT et al., 2019).

#### 2.2.9. Ensaio de morte celular: apoptose e necrose

As células MB49 e BALB/3T3 foram plaqueadas em placa preta 96 poços (Corning Incorporated, NY, EUA) nas mesmas condições descritas no item 3.5 e expostos as NPs na concentração que apresentou os melhores resultados nos ensaios anteriores (23,16  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). Após a exposição de 24 horas, as células foram lavadas com tampão PBS (1X) e submetido ao ensaio de apoptose e necrose usando laranja de acridina/brometo de etídio (AO/EB) 1 mg/mL por 10 min e, em seguida, lavadas com meio DMEM sem fenol. A contagem total de células vivas, apoptóticas e células necróticas, bem como a análise da morfologia celular, foi realizada no ImageXpress Micro (Molecular Dispositivo) com filtro de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de 590 nm.

#### 2.2.10. Análises estatísticas

Os dados foram representados pela média e erro padrão. Os dados seguiram a distribuição normal; de acordo com o teste de Shapiro-Wilk. As diferenças entre os grupos foram determinadas usando os testes ANOVA e Newman-Keuls para comparações múltiplas. Os dados foram analisados pelo teste exato de Fisher. O software utilizado para as análises foi o GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os testes foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de  $p < 0.05$ .

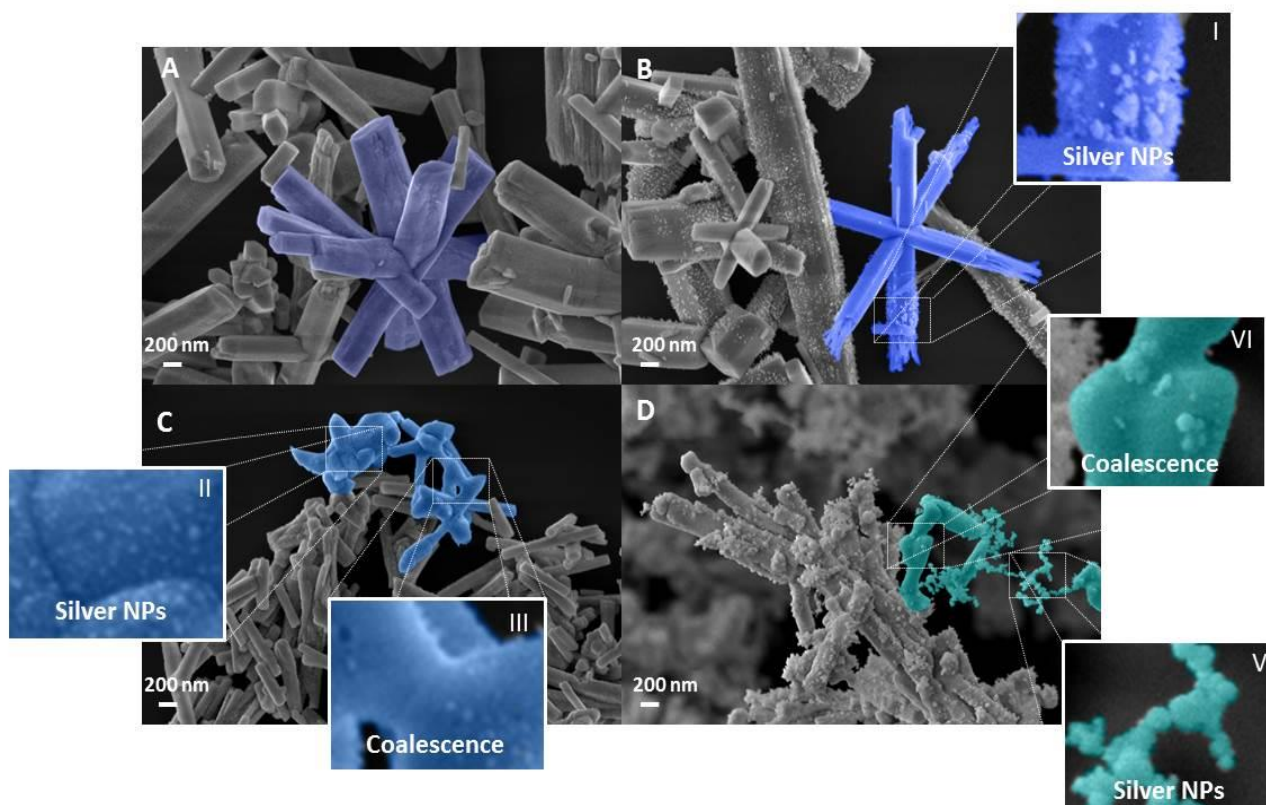
## 2.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1. Caracterização de $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>

Para o presente estudo, quatro amostras foram estudadas: compósito puro ( $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:N), compósito irradiado com elétrons ( $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:E), compósito irradiado por um feixe de laser femtossegundo (fs) sob condições não focalizadas ( $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:NF), e compósito irradiado por um feixe de laser fs sob condições focalizadas ( $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>: F).

A **Figura 7** apresenta as imagens das amostras obtidas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM). Na amostra de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:N (**Figura 7A**), a formação de AgNPs não foi observada, pois o sistema não foi perturbado por qualquer fonte de energia externa. Para o compósito  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:E (**Figura 7B**), é possível observar a formação de nucleações e crescimento de filamentos de AgNPs quando  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> é irradiado usando um feixe de elétrons acelerado por um microscópio eletrônico sob alto vácuo, conforme relatado por Andrés et al (ANDRÉS et al., 2014). Na **Figura 7C**, o composto  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:NF exibe um pequeno número de AgNPs anexados à superfície do semiconductor (semelhante ao composto  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:E) e uma ligeira sinterização de rods  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, enquanto o compósito  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:F (**Figura 7D**), apresenta grandes quantidades de AgNPs esféricas com um tamanho de partícula maior do que encontrado em  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:NF, provavelmente devido a um aumento do processo de sinterização experimentado pelos microbastões  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, conforme observado por Andrés et al. (ANDRÉS et al., 2014).

$\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> sem qualquer irradiação é um semiconductor do tipo n, com carga positiva e buracos em sua estrutura, que combinados com o efeito de AgNP presente em sua estrutura, apresenta alto grau de oxidação (ASSIS et al., 2018; LAIER et al., 2020). Sob irradiação de feixe de elétrons e laser fs, o semiconductor  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> torna-se n/p devido à nucleação e formação de AgNP disponíveis. Ao contrário, quando  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> sofre irradiação fs de modo focalizado ( $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:F), o distúrbio estrutural da amostra é aumentado, uma vez que o feixe de laser fs está concentrado em regiões localizadas da superfície da amostra, promovendo um aumento no processo de segregação de AgNPs a partir do semiconductor  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.



**Figura 7.** Imagem obtidas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM) das amostras de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$  obtidas após as respectivas radiações: (A)  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ ; (B)  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:E}$  (C)  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:NF}$ ; (D)  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:F}$ . Fonte: Autoria própria.

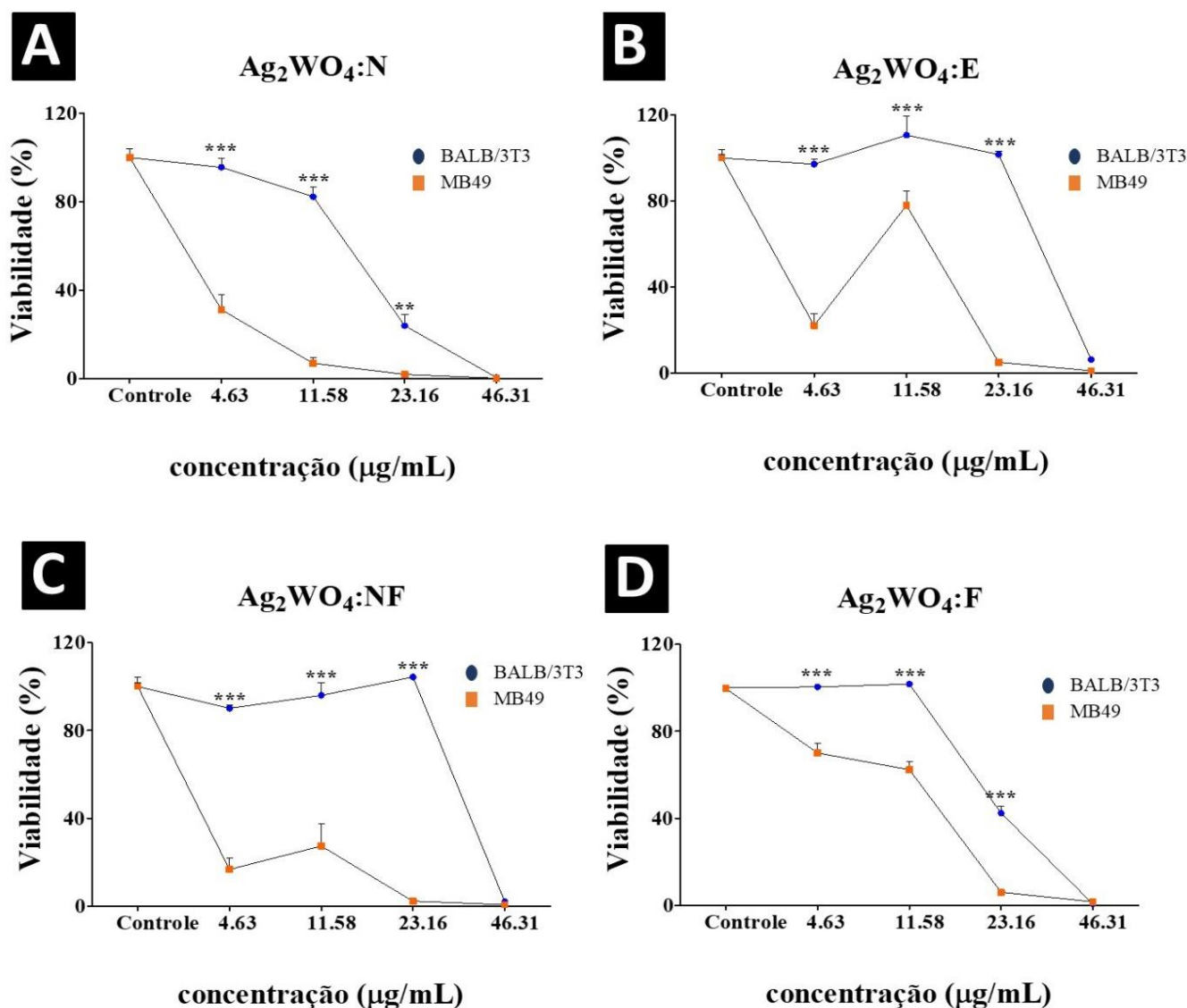
### 2.3.2. Viabilidade celular expostas as amostras de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$

Neste estudo, analisamos a viabilidade das células MB49 e BALB/3T3 expostas às diferentes amostras de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$  por 24 horas. Com relação ao principal efeito da amostra não-irradiada,  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:N}$  (**Figura 8A**), a cultura de células BALB/3T3 apresentou 95% e 80% de viabilidade celular quando exposta às concentrações de 4.63 e 11.58  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, enquanto as células tumorais MB49 apresentaram 30% e 10% de viabilidade celular em comparação com o grupo controle (CT). Em relação às outras concentrações, a perda de viabilidade foi intensa para ambos os tipos de células. Para o composto  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:E}$ , as células BALB/3T3 expostas às concentrações de 4.63, 11.58 e 23.16  $\mu\text{g/mL}$  apresentou viabilidade equivalente ao grupo CT, enquanto a célula MB49 apresentou redução significativa da viabilidade, 20%, 80% e 5%, respectivamente (**Figura 8B**). Este aumento da viabilidade celular na concentração intermediária (11.58  $\mu\text{g/mL}$ ) demonstra que esta amostra apresenta um comportamento não linear para células tumorais MB49.

Para o composto  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:NF, as células BALB/3T3 exposta às concentrações 4.63, 11.58 e 23.16 µg/mL, apresentaram viabilidade equivalente ao CT em contraste com a cultura de MB49 que apresentou redução significativa (16%, 27% e 2% respectivamente) para as mesmas concentrações (**Figura 8C**), com perfil de atividade muito semelhante ao  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:E. Para  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:F, as células BALB/3T3 expostas às concentrações 4.63 e 11.58 µg/mL da amostra apresentaram viabilidade superior a 95%, enquanto a célula MB49 apresentou viabilidades de 70% e 62%, respectivamente (**Figura 8D**). No entanto, para concentrações acima, a toxicidade dessa amostra foi maior em relação à  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:NF e  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:E, conferindo-lhe capacidade citotóxica inespecífica.

Comparando os resultados apresentados, podemos observar que em relação à amostra que não recebeu nenhuma forma de irradiação, a ordem da atividade antitumoral quando as células foram expostas à concentração mais eficaz (23.16 µg/mL), foram:  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:NF >  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:E >  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:F >  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:N. A literatura tem mostrado que AgNPs exibe atividade antitumoral dependente do tamanho, dose/concentração e tempo de exposição, por ser endocitadas mais facilmente por células tumorais (que possuem vasos com calibres maiores) (JEONG; LIM; CHOI, 2014; WU et al., 2019), uma vez que devido à maior relação superfície/volume, pode induzir citotoxicidade e genotoxicidade mais significativa (XU et al., 2020; YEASMIN et al., 2017),

Assim, nossos dados podem estar diretamente relacionados às variações nas quantidades e tamanho de AgNP formada na superfície das amostras após as respectivas irradiações (**Figura 7**), sendo que não apenas o efeito plasmônico foi potencializado como também a seletividade, uma vez que as células neoplásicas foram as mais afetadas pelos efeitos dos novos aglomerados de tungstênio e prata (ASSIS et al., 2018; FOGGI et al., 2017; LONGO et al., 2013).



**Figura 8.** Viabilidade de células MB49 e BALB/3T3 expostas às diferentes amostras de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$  nas diferentes concentrações: 4,63; 11,58; 23,16; 46,31  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente, por 24 h ( $n=3$ ). (A)  $\text{Ag}_2\text{WO}_4\text{:N}$ ; (B)  $\text{Ag}_2\text{WO}_4\text{:E}$ ; (C)  $\text{Ag}_2\text{WO}_4\text{:NF}$ ; (D)  $\text{Ag}_2\text{WO}_4\text{:F}$ . As barras representam os valores médios  $\pm$  o erro padrão médio (SEM). As diferenças estatísticas foram estabelecidas por ANOVA de dois fatores com análise post-hoc usando o teste de Dunnett. Os valores estatisticamente significantes foram:  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,01$  (\*\*). Fonte: Autoria própria.

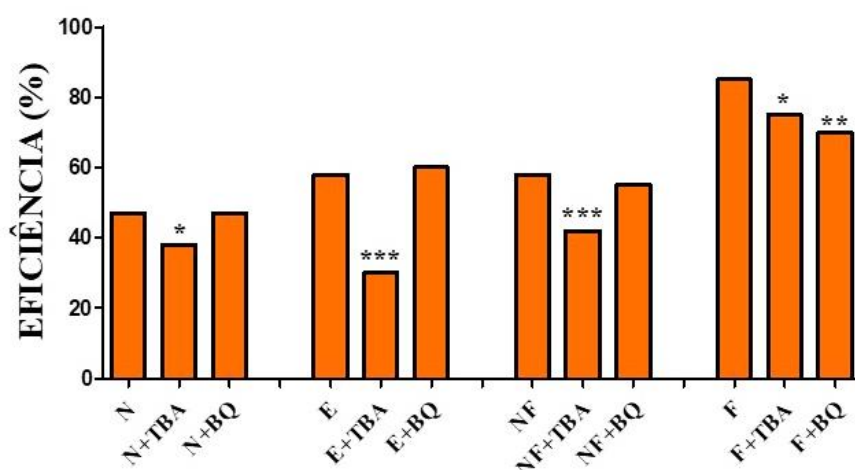
### 2.3.2. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio por amostras de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$

No geral, o efeito sinérgico entre a absorção aprimorada de luz e separação elétron-buraco eficiente desempenham um papel importante no aumento da atividade das amostras. Na atividade fotocatalítica de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ , foi proposto um mecanismo envolvendo três etapas: (i) Absorção de luz e excitação de fotoelétrons, ou seja, os elétrons são excitados da banda de condução (CB) para a banda de valência (VB) e os buracos fotogerados aparecem na VB; (ii)



Formação do radical livre, os quais os fotoelétrons em CB na superfície do semicondutor reagiria com as substâncias circundantes, como a molécula de  $O_2$  para gerar o radical  $O_2^{\cdot-}$ , que poderia se transformar em EROs, incluindo  $OH^{\cdot}$  ou  $H_2O_2$ , por sucessivos processos fotoquímicos; e (iii), os buracos fotogerados em VB podem render  $OH^{\cdot}$  combinando com  $OH^-$ , sendo a última etapa corresponde a rearranjos de oxidação do radical envolvendo EROs (LAIER et al., 2020).

Para avaliar a produção de EROs pelas amostras de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ , foram realizados testes de atividade fotocatalítica (**Figura 9**). Para esses testes, foram usadas a benzoquinona (BQ) para capturar a produção do radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e álcool terc-butílico (TBA) para capturar a produção do radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), uma vez que essas espécies estão diretamente ligadas ao estresse oxidativo e a posterior morte celular. Os dados mostram que  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:N}$  apresenta uma baixa eficiência na fotocatalise (~ 40%) e quando o TBA é adicionado, esse valor diminui, indicando uma pequena ação do radical  $OH^{\cdot}$  nos processos oxidativos. O mesmo foi feito adicionando BQ ao  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:N}$ , mas a atividade fotocatalítica permaneceu constante, mostrando que a porção  $O_2^{\cdot-}$  não é gerado pela amostra. Já para as amostras  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:E}$  e  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:NF}$ , quando o TBA é adicionado ao processo, ocorre uma redução da eficiência fotocatalítica, indicando maior participação do radical  $OH^{\cdot}$ . Por sua vez, a amostra de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:F}$  foi a única que apresentou produção de ambos os radicais  $O_2^{\cdot-}$  e  $OH^{\cdot}$ , uma vez que tanto TBA quanto BQ apresentaram redução, causando um aumento em sua eficiência fotocatalítica.

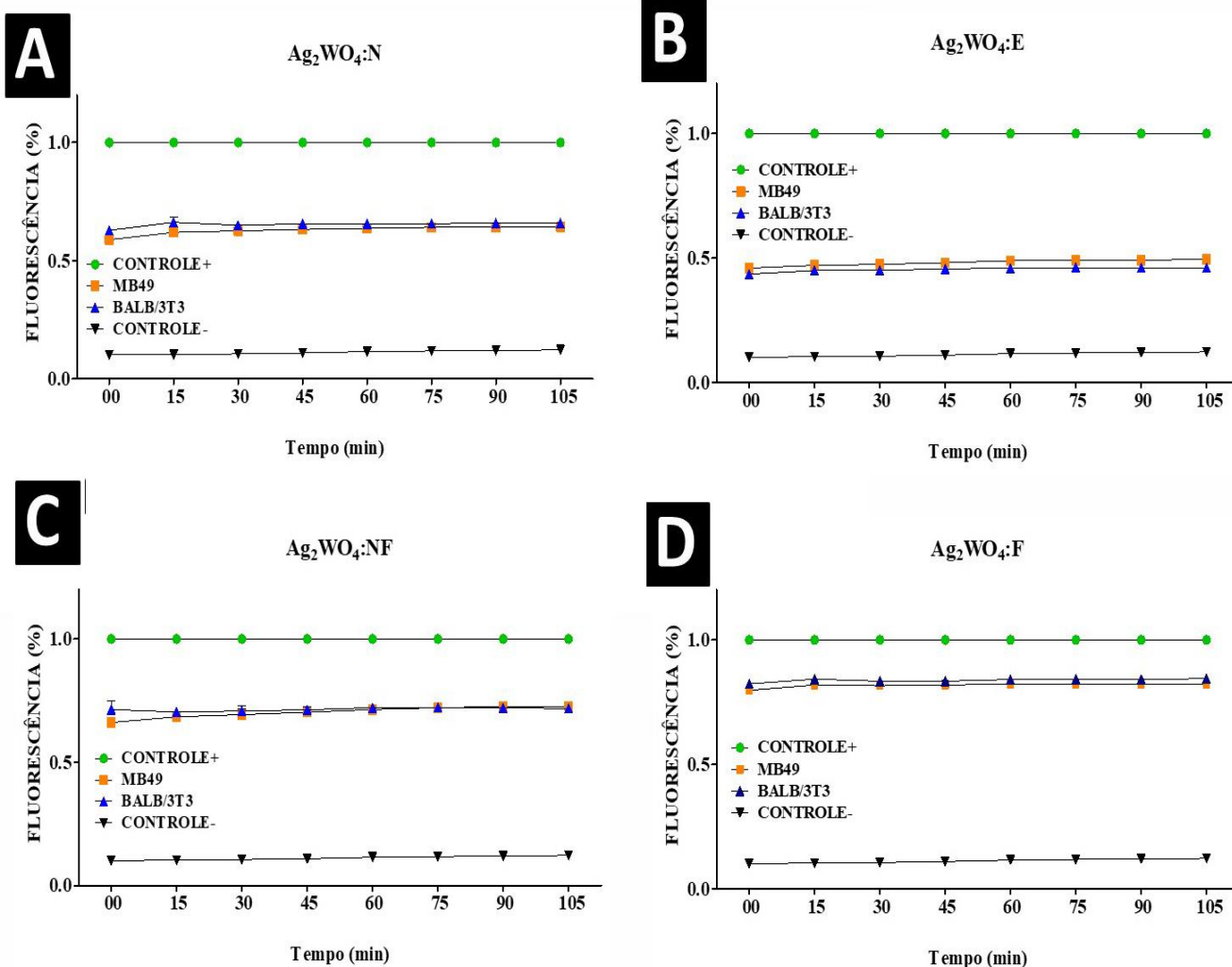


**Figura 9.** Gráfico representativo da análise da produção de EROs por amostras de AgNPs/ $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ . Para cada amostra (N; E, NF, F) foram adicionados BQ (quantifica a produção de  $O_2^{\cdot-}$ ) e TBA (quantifica a produção de  $OH^{\cdot}$ ). A diminuição das barras demonstra a produção de cada tipos de EROs). As diferenças estatísticas foram estabelecidas por ANOVA de dois fatores com análise post-hoc usando o teste de Dunnett. Os valores estatisticamente significantes foram:  $p < 0,001$  (\*\*\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,1$  (\*). Fonte: Autoria própria.

Em condições fisiológicas, EROs são subprodutos do metabolismo celular aeróbico (PRASAD; GUPTA; TYAGI, 2016) e a oxidação de substratos são altamente reativos devido à presença de elétrons livres desemparelhados. No entanto, a concentração de EROs é mantida em quantidades baixas por mecanismos de defesa antioxidante (MAO et al., 2018; NAYAK et al., 2016), os quais atuam como um fator na diferenciação, progressão, parada do crescimento celular, apoptose e resposta imune (LI et al., 2016). No entanto, quando EROs são acumulados em grandes quantidades, as células entram em estado de estresse oxidativo que induz uma infinidade de alterações disfuncionais em macromoléculas como DNA e lipídios, entre outros que pode levar à morte celular (DAYEM et al., 2017; KELTS et al., 2015; TAUFFENBERGER; MAGISTRETTI, 2021).

Avalos e colaboradores mediram a produção de EROs induzida por tamanhos distintos de AgNPs em células tumorais HepG2 e HL-60. Os resultados mostraram que a maior produção de EROs pode ser atribuída a um aumento na superfície das NPs (AVALOS et al., 2014). Já no trabalho de Hussain e colaboradores também foi demonstrado que para NPs de TiO<sub>2</sub>, a modulação de EROs foi proporcional à reatividade de sua pequena área (HUSSAIN et al., 2009).

Para avaliar o estresse oxidativo provocado pelo tratamento, foram mensuradas as quantidades de EROs no interior das células MB49 e BALB/3T3 após exposição às respectivas amostras de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, na concentração de 23.16  $\mu$ g/mL em comparação com controle positivo (1.0 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e negativo (células sem tratamento). A **Figura 10** ilustra a cinética de quantificação de EROs intracelular no intervalo de 105 minutos. A maior quantidade de EROs foi alcançado com a exposição à amostra de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:F, a partir do início da quantificação e se mantendo constante ao longo do período de análise. No entanto, mesmo não havendo diferença nas quantidades das espécies oxidativas entre ambas as linhagens, o alto grau de citotoxicidade de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:F afeta a viabilidade das células tumorais e não tumorais (**Figura 8**).



**Figura 10.** Detecção intracelular de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por células BALB/3T3 e MB49, expostas às amostras de: (A)  $\text{Ag}_2\text{WO}_4\text{:N}$ ; (B)  $\text{Ag}_2\text{WO}_4\text{:E}$ ; (C)  $\text{Ag}_2\text{WO}_4\text{:NF}$ ; (D)  $\text{Ag}_2\text{WO}_4\text{:F}$ , na concentração de  $23.16 \mu\text{g/mL}$  respectivamente até 105 min. Fonte: Autoria própria.

Ao contrário disso, as diferenças quanto a formação de AgNP encontradas na superfície das amostras  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:NF}$  e  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:E}$  (Figura 7) foram capazes de produzir um efeito citotóxico seletivo para células tumorais (Figura 8). No entanto, essa característica provavelmente está relacionada ao processo específico de formação de EROs por ambas as amostras ( $\text{OH}^*$ - Figura 9).

Para células tumorais a alta produção de EROs tem papel fundamental para indução da progressão tumoral, aumentando a expressão de genes, como a enzima superóxido dismutase (SOD) (HEMPEL et al., 2009; KIM et al., 2017). Embora os tumores sejam um sistema multifatorial, existe um limiar entre a resposta fisiológicas e o estresse oxidativo.

Nossos resultados pode ter relação com a capacidade antioxidante e manutenção da homeostasia e integridade das células não-tumorais em comparação com as células tumorais (GOOSSENS et al., 1995; HUMPHREYS; WILSON, 1999).

### 2.3.3. Morte Celular: apoptose e necrose

Nanopartículas são consideradas elementos capazes de desencadear vias de morte celular (AKHTAR et al., 2012; ASHIKBAYEVA et al., 2019; ZHANG et al., 2014). O estresse oxidativo induzido ligado à rede apoptótica intrínseca (efeitos mitocondriais) ou extrínseca (efeito citoplasmático) é atualmente a descrição mais aceita (SARKAR et al., 2011), e muitos estudos *in vitro* identificaram um aumento significativo nos níveis de EROs como um fator de toxicidade (NEL et al., 2006; ORRENIUS; NICOTERA; ZHIVOTOVSKY, 2010; SHVEDOVA; KAGAN; FADEEL, 2010), regulando a expressão de proteínas apoptóticas. Os sinais produzidos em resposta a esses estímulos aumentam a permeabilização das mitocôndrias, interrupção da síntese de ATP (MANNA et al., 2012; SARKAR et al., 2011), peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao DNA/RNA (ZHANG; SHEN; GURUNATHAN, 2016).

Anteriormente foi demonstrada que tamanhos menores de AgNPs podem desempenhar papel importante na regulação da expressão gênica de células tumorais, uma vez que podem causar metilação ao DNA, erros de emparelhamento de bases e provocar aberrações cromossômicas (ASHARANI; HANDE; VALIYAVEETIL, 2009; HCT et al., 2018; TAVAKOLI et al., 2018), que por sua vez, pode refletir diretamente na regulação das funções proteicas da progressão e ciclo celular (BAHARARA et al., 2015).

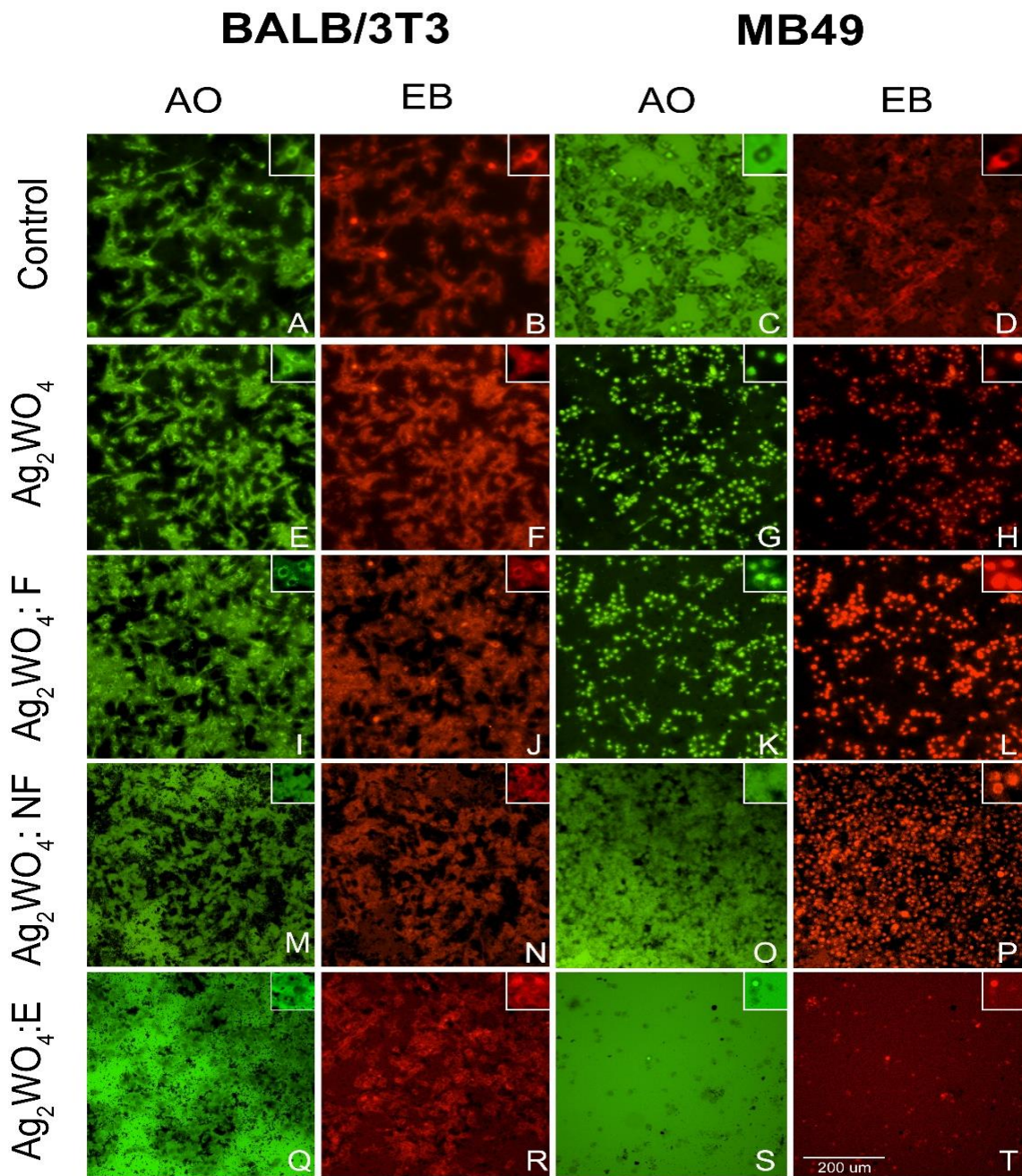
O teste de coloração com os fluorescentes laranja de acridina/brometo de etídio (AO/EB) é um método rápido eficaz para determinar mudanças morfológicas nas estruturas dos núcleos e para distinção dos processos apoptóticos e necróticos desde a fase inicial até a tardia (CINIGLIA et al., 2010). Ao analisarmos o tipo específico de morte causado por cada amostra de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> na concentração 23.16 µg/mL por meio do ensaio com os fluoróforos, foi possível observar diferenças significativas na resistência entre as linhagens BALB/3T3 e MB49 em relação ao tipo de morte celular.

Os resultados apresentados na **Figura 11** mostra que as células BALB/3T3 expostas ao  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> não apresentam indícios visuais de morte celular, mantendo a integridade de suas

membranas e da morfologia celular, uma vez que as regiões nucleares não expuseram as regiões de ligações específicas com os corantes e, portanto, não apresentando ligações que caracterize o processo de morte celular (**Figura 11: AO–/EB–**). No entanto, assim como demonstrado no ensaio de viabilidade celular, para a mesma concentração testada, as amostras de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:N}$  e  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:F}$  apresentaram redução significativa da viabilidade de BALB/3T3. Essa diferença entre os resultados obtidos, provavelmente pode ser interpretado como a redução/inibição do metabolismo das células não-tumorais e não pela morte ocasionado por essas amostras.

Ao contrário, quando MB49 foram expostas ao  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:N}$  (**Figura 11G, H: AO +/EB–**), as células tumorais apresentaram sinais de apoptose, que pode ser observado a formação de corpúsculos apoptóticos nas regiões nucleares intensamente ligadas ao corante laranja de acridina. Para a amostra de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:F}$ , foi evidenciado o processo de apoptose tardia (**Fig. 11K, L: AO +/EB +**), uma vez que a região nuclear apresenta dupla marcação por ambos os fluoróforos, caracterizando o início da fragmentação da membrana celular. Já para a amostra  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:NF}$ , a necrose foi evidenciada pela alta intensidade de marcação nuclear com o corante brometo de etídio, apresentando destruição celular. Por fim, as células tumorais expostas ao  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:E}$  não foram possíveis de serem observadas e apenas detritos celulares foram evidenciados (**Fig. 11 O, P: AO +/EB +**).

Aqui, podemos assumir que as células não-tumorais podem apresentar mecanismos que permitem sua sobrevivência quando expostas ao estresse oxidativo induzido pelas amostras de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ . Essa seletividade provavelmente está associada aos mecanismos de resistência celular que sofrem interferência das amostras com a capacidade das células de compensar as mudanças causadas (BENDALE; BENDALE; PAUL, 2017).



**Figura 11.** Ensaio de morte celular (apoptose e necrose). AO/EB: laranja de acridina/brometo de etídio. (A) células controle BALB/3T3 ausentes de apoptose, não apresentam regiões de ligação nuclear aos fluoróforos; (B) células controle BALB/3T3 ausentes da necrose, impermeáveis ao EB; (C) células controle MB49 ausente da apoptose, não apresentam regiões de ligação nuclear aos fluoróforos; (D) células de controle MB49 ausentes da necrose, impermeáveis ao EB; (E) células BALB/3T3 exposto ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> ausência de morte por apoptose; (F) células BALB/3T3 exposto ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> ausência quantidade de morte por necrose; (G) células MB49 exposto ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> grande quantidade de morte por apoptose; (H) células MB49 exposto ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> ausência de morte necrótica; (I) células BALB/3T3 expostas ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:F, ausência de morte por apoptose; (J) células BALB/3T3 expostas ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:F, ausência de morte por necrose; (K) células MB49 expostas ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:F, grande quantidade de morte por apoptose; (L) células MB49 expostas ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:F, grande quantidade de morte por necrose; (M) células BALB/3T3 expostas ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:NF, ausência de morte por apoptose; (N) células BALB/3T3 expostas ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:NF, ausência de morte por necrose; (O) células MB49 expostas ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:NF, ausência de morte por apoptose; (P) células MB49 expostas ao Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>:NF, grandes quantidade de morte por necrose; (Q) células

BALB/3T3 expostas ao  $\text{Ag}_2\text{WO}_4\text{:E}$ , ausência de morte por apoptose; (R) células BALB/3T3 expostas ao  $\text{Ag}_2\text{WO}_4\text{:E}$ , ausência de morte por necrose; (S e T) detritos de células MB49 exposto ao  $\text{Ag}_2\text{WO}_4\text{:E}$ . Fonte: Autoria própria.

## 2.4. CONCLUSÃO

No trabalho atual, construímos um interessante composto formado por AgNPs e  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ , formado por irradiação de feixe de elétrons e por laser femtossegundo em  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ , e seu notável desempenho superior na atividade antitumoral foi demonstrado. O efeito sinérgico de AgNPs no semicondutor  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$  foi capaz de aumentar sua eficiência antitumoral. Para tanto, os melhores resultados foram alcançados pelo  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:NF}$  e  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4\text{:E}$ , que apresentaram maior seletividade e eficácia contra a ação das células tumorais MB49 e maior viabilidade celular de células não-tumorais BALB/3T3. Portanto, a irradiação pode em geral apresentar um efeito benéfico sobre o alvo, transmitindo ao material novas propriedades a serem exploradas.

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Ag Nanoparticles/ $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> Composite Formed by Electron Beam and Femtosecond Irradiation as Potent Antifungal and Antitumor Agents

Received: 28 November 2018  
Accepted: 20 June 2019  
Published online: 09 July 2019

M. Assis<sup>1</sup>, T. Robledo<sup>2</sup>, C. C. Foggi<sup>1</sup>, A. M. Kubo<sup>1</sup>, G. Mínguez-Vega<sup>3</sup>, E. Condoncillo<sup>4</sup>, H. Beltran-Mir<sup>4</sup>, R. Torres-Mendieta<sup>5</sup>, J. Andrés<sup>6</sup>, M. Oliva<sup>6</sup>, C. E. Vergani<sup>7</sup>, P. A. Barbugli<sup>7</sup>, E. R. Camargo<sup>1</sup>, R. C. Borra<sup>2</sup> & E. Longo<sup>1</sup>

The ability to manipulate the structure and function of promising systems via external stimuli is emerging with the development of reconfigurable and programmable multifunctional materials. Increasing antifungal and antitumor activity requires novel, effective treatments to be diligently sought. In this work, the synthesis, characterization, and *in vitro* biological screening of pure  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, irradiated with electrons and with non-focused and focused femtosecond laser beams are reported. We demonstrate, for the first time, that Ag nanoparticles/ $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> composite displays potent antifungal and antitumor activity. This composite had an extreme low inhibition concentration against *Candida albicans*, cause the modulation of  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, perform the fungicidal activity more efficient. For tumor activity, it was found that the composite showed a high selectivity against the cancer cells (MB49), thus depleting the populations of cancer cells by necrosis and apoptosis, without the healthy cells (BALB/3T3) being affected.



## CAPÍTULO 2

**Decoração de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  com Au pode aumentar a seletividade tumoral sem comprometer a eficiência antitumoral das Nanopartículas *in vitro* contra uma linhagem de tumor de bexiga murino.**

## RESUMO

O fosfato de prata ( $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ ) é um semicondutor cujo efeito varia de acordo com seu tamanho e forma. No entanto, a concentração de prata presente em sua estrutura, pode torná-lo altamente tóxico e não-seletivo, devido a alta capacidade de induzir estresse oxidativo. Para tanto, seus efeitos podem ser calibrados com a combinação com outras NP, como o ouro (AuNP). AuNP são altamente funcionais devido ao seu pequeno tamanho, efeitos de superfície, de tamanhos quânticos e ópticos, e alta compatibilidade biológica. No presente estudo, avaliamos a atividade de um novo  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  decorado com AuNP (denominado  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$ ) quanto sua atividade citotóxica e os principais mecanismos de ação que respondem ao efeito seletivo em células tumorais. Os resultados mostraram que em relação a morte celular, as amostras foram capazes de provocar predominantemente necrose em células tumorais de bexiga (MB49), enquanto mantiveram a integridade das células não-tumorais (L929). Ainda, em concentrações abaixo da citotóxica,  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$  foi capaz de inibir a atividade clonogênica e migratória das células MB49, apresentando potencial como tratamento antimetastático. Esses resultados ainda podem ser explicados pela alta capacidade de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$  em produzir  $\text{OH}^*$  e  $\text{O}_2^{\cdot -}$  em relação ao  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ . Em conclusão,  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$  apresentam características que o tornam uma NP potencial contra o câncer de bexiga.

## ABSTRACT

Silver phosphate ( $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ ) is a semiconductor whose effect varies according to its size and shape. However, the concentration of silver present in its structure can make it highly toxic and non-selective, due to its high capacity to induce oxidative stress. To do so, its effects can be calibrated by combining with other NPs, such as gold (AuNP). AuNP are generally highly functional due to their small size, surface effects, quantum and optical size effects, and high biological compatibility. In the present study, we evaluated the activity of a new AuNP-doped  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  (named  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$ ) regarding its cytotoxic activity and the main mechanisms of action that respond to the selective effect on tumor cells. The results showed that in relation to cell death, the sample were able to predominantly provoke necrosis in bladder cancer cells (MB49), while maintaining the integrity of non-tumor cells (L929). Also, at concentration below cytotoxic,  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$  was able to inhibit the clonogenic and migratory activity of MB49 cells, showing potential as an antimetastatic treatment. These results can still be explained by the high capacity of  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$  to produce  $\text{OH}^*$  and  $\text{O}'_2$ , in relation to  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ . In conclusion,  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$  has characteristics that make it a potential NP against bladder cancer.

### 3.1.INTRODUÇÃO

Semicondutores são um grupo de materiais que possuem diversas aplicações tecnológicas (ASSIS et al., 2019a; DA COSTA et al., 2020; DE FOGGI et al., 2020; PIMENTEL et al., 2020). Particularmente, o fosfato de prata ( $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ ), pertencente a este grupo e tem sido estudado para aplicação em diversas áreas, como agente antimicrobiano (LIU et al., 2012b; OLIVEIRA et al., 2021; STECKIEWICZ et al., 2019; WU et al., 2013) e fotocatalisadores de corantes (GURUNATHAN et al., 2013; HUA et al., 2014; LUO et al., 2014). Seu sucesso se deve a uma série de fatores, como band gap relativamente baixo, facetas expostas altamente reativas e taxa de recombinação de pares elétron-buraco fotogerados ( $e^-/h^+$ ) (BOTELHO et al., 2015, 2016).

A utilização de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  como agente bactericida foi demonstrado por Lee e colaboradores devido a dissociação de íons  $\text{Ag}^+$  e  $\text{PO}_4^-$  de forma estável e controlada (LIU et al., 2012a).  $\text{Ag}^+$  tem alta capacidade de danificar a membrana bacteriana e gerar EROs no interior da célula, que pode afetar diretamente proteínas e o material genético. Por sua vez,  $\text{PO}_4^-$  foi demonstrado participar da interconversão de ATP em ADP, podendo afetar o metabolismo e a proliferação bacteriana (LIU et al., 2012a).

A toxicidade do  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  em células de mamíferos foi relatada anteriormente por Steckiewicz e colaboradores. O estudo demonstra que o efeito de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  varia de acordo com o tamanho e a forma da NP e, principalmente, a concentração de prata presente em sua estrutura (STECKIEWICZ et al., 2019) induzindo, por sua vez, o alto grau de estresse oxidativo, a injúria à membrana celular e danos ao material genético, os quais provocam a morte celular (SALIEV et al., 2019; STECKIEWICZ et al., 2019; SUR et al., 2010). No entanto, a associação com outras nanopartículas poderia calibrar esses efeitos não seletivos de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ . Uma das possibilidades seria a combinação com nanopartículas de ouro (AuNP) (PAINO et al., 2012).

Por muitos séculos, o ouro (Au) foi utilizado na área da saúde para diagnóstico e tratamentos de doenças (FRANK SHAW, 1999; FRICKER, 1996). Atualmente, tem sido empregado especialmente para administração de medicamentos, imagem molecular e terapias contra câncer (ALKILANY; MURPHY, 2010; LEWINSKI; COLVIN; DREZEK, 2008). AuNP, geralmente são altamente funcionais devido às suas propriedades físico-química, tais como, pequeno tamanho, efeitos de superfície, efeitos de tamanhos quânticos e ópticos (XIE et al., 2018) e alta compatibilidade biológica (ALRIC et al., 2013; LONGMIRE; CHOYKE; KOBAYASHI, 2008).

AuNPs foram investigadas no contexto de terapias contra uma variedade de tipos de neoplasias e, já relatadas como uma alternativa à muitos quimioterápicos não seletivos, como um meio pelo qual, reduz efeitos colaterais indesejáveis ocasionados pelos tratamentos convencionais (JAIN; HIRST; O'SULLIVAN, 2012). Devido aos defeitos na camada epitelial da vasculatura do microambiente tumoral, as AuNPs provavelmente são direcionadas com mais facilidade para o tumor, causando alta seletividade entre as células (MAEDA, 2001). Pelo acúmulo de AuNPs e, conseqüentemente, o estresse oxidativo provocado em células neoplásicas, a ativação de via da caspase-3 e 9, ativação de MAP-quinase, fragmentação do DNA e disfunção mitocondrial, podem induzir, por sua vez, a morte celular por apoptose e necrose (BALASUBRAMANIAN et al., 2010; PAN et al., 2009; SHUKLA et al., 2005). Além disso, estudos anteriores analisaram a expressão de mRNA e, demonstraram que o tratamento com AuNPs pode causar regulação positiva de genes relacionados à inflamação, diminuição na expressão dos genes do ciclo celular e autofagia de células neoplásicas (LI et al., 2010; LIU et al., 2019).

Neste contexto, nosso grupo desenvolveu um inovador  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  decorado com nanopartículas de ouro ( $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$ ), sintetizado através do método de co-precipitação simples (CP). Pelo exposto acima, podemos inferir que a combinação de Au com  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  poderia melhorar as características de seletividade tumoral sem comprometer a eficiência antitumoral. Para testar essa hipótese, comparamos a atividade citotóxica do  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$  sobre uma linhagem tumoral de câncer de bexiga murino e de fibroblastos, considerada controle.

## **3.2.OBJETIVOS**

### **3.2.1. OBJETIVOS GERAIS**

A partir das modificações provocadas pela decorado de AuNP na superfície de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ , o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade citotóxica e seletiva de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{:Au}$  em relação ao  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ .

### **3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Para avaliar a atividade de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{:Au}$ , foram realizadas as seguintes análises:

- Síntese de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{:Au}$  pelo método de co-precipitação simples;
- Análise da viabilidade de células MB49 e L929 expostas às amostras  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{:Au}$  em diferentes concentrações;
- Análise da viabilidade celular em diferentes tempos de exposição às amostras de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{:Au}$ ;
- Análise qualitativa de citotoxicidade: Apoptose e Necrose em MB49 e L929;
- Análise da produção específica de espécies reativas de oxigênio (EROs) por  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{:Au}$ ;
- Quantificação Intracelular de EROs em MB49 e L929;
- Análise de mecanismos metastáticos: teste de inibição da formação de colônia (MB49);
- Análise de mecanismos metastáticos: teste de inibição dos processos de migração celular (MB49).

### 3.3.MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.3.1. Síntese de Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:Au

A síntese das NPs foram realizadas pelos pesquisadores do Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC) do Departamento de Química (DQ) da Universidade Federal de São Carlos, através do método de co-precipitação simples (TRENCH et al., 2018). Resumidamente,  $1 \times 10^{-3}$  mol de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (98,6%, JT Baker) e,  $3 \times 10^{-3}$  mol de AgNO<sub>3</sub> (99,8%, Vetec) foram dissolvidos em 50,0 mL de água destilada em recipientes separados. Quando ambas as soluções atingiram 90°C, a solução de Ag<sup>+</sup> foi adicionada à solução de (PO<sub>4</sub>)<sup>3-</sup>, deixada em agitação por 10 min, obtendo-se ao final um precipitado amarelo. Este precipitado foi lavado e seco a 60°C durante 24 horas. A solução de AuNPs foi obtida pela adição de 1,0 mL de solução HAuCl<sub>4</sub> (99,9%, Merck) a 0,1 M em 98,0 mL de água destilada a 95°C. Em seguida, 1,0 mL de solução de Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (0,3 M) foi adicionado para obter uma solução vermelha escura. A solução foi deixada sob agitação durante 5 minutos. Para obter Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:Au, 100,0 mg de Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> foram adicionados a 20,0 mL da solução de AuNPs e deixados sob agitação em temperatura ambiente por 12 horas. Por último, o pó foi centrifugado e seco a 60°C por 24 horas.

#### 3.3.2. Cultura de MB49 e L929

Fibroblastos murinos (L929) e células de carcinoma urotelial de bexiga murino (MB49), foram cultivadas em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) com alta concentração de glicose e 2 mmol/L de L-glutamina (Cultilab, Campinas, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Cultilab) e 1% de penicilina + estreptomicina (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brasil) (DMEM completo) em incubadora a 37°C, com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.3.3. Viabilidade celular na exposição das amostras em diferentes concentrações

As células L929 e MB49 foram semeadas em placas de cultura de 96 poços (Corning Incorporated, NY, EUA) na concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço em meio de cultura DMEM (Gibco, Life Technologies, EUA) completo e mantidas incubadas pelo período de adesão. As células foram expostas às nanopartículas de Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:Au nas seguintes concentrações:

2.0; 1.0; 0.5; 0.25; 0.12; 0.06 mg/mL e um controle negativo contendo apenas células, sendo o experimento realizado em triplicata. As células foram incubadas por 24 horas e, após o período de exposição, as células resultantes foram lavadas cuidadosamente com tampão fosfato (PBS 1X) e o teste de viabilidade celular realizado pela adição de 200 µL/poço da solução de Resazurina 70 mM (Sigma-Aldrich, EUA), mantendo por 4 horas seguintes (BORRA et al., 2009). As leituras de absorvância foram feitas no espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 e 600 nm.

#### 3.3.4. Viabilidade celular em diferentes tempos de exposição

Para avaliar o melhor tempo de exposição das nanopartículas às células, ambas as linhagens celulares foram semeadas de acordo com o experimento anterior. A seguir, as células foram expostas à concentração que apresentou o melhor resultado no teste de 24 horas (0.12 mg/mL) e um controle negativo contendo apenas células, sendo o experimento realizado em triplicata. As células foram expostas às nanopartículas de Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:Au pelos tempos de 1, 2, 4, 16 e 32 horas e, posteriormente submetidas ao teste de viabilidade celular.

#### 3.3.5. Citotoxicidade: Apoptose e Necrose

As células foram plaqueadas em placas de cultura pretas (Corning Incorporated, NY, USA) e tratadas com os materiais descritos no item anterior. Após um período de exposição de 1 hora ao Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:Au na concentração 0.12 mg/mL, as células foram lavadas com tampão PBS (1X). Em seguida, foram adicionados a cada poço tratado 20 µL do reagente laranja de acridina/brometo de etídio na concentração de 10 µg/mL. O controle negativo continha apenas células sem tratamento, e como controle positivo, foram utilizadas células tratadas com camptotecina na concentração de 10 µg/mL (Sigma-Aldrich, EUA). As células foram então incubadas em temperatura ambiente por exatamente 10 minutos protegidas da luz. A fluorescência das células foi determinada pelo ImageXpress Micro XLS Widefield (Molecular Devices, Canadá), com parâmetros de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de 590 nm. Imagens da coloração de células como laranja de acridina e brometo de etídio foram obtidas, o que permitiu verificar a distinção entre células viáveis, apoptóticas e necróticas.



### 3.3.6. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) por $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ e $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$

Para a identificação da produção de EROs pelas NPs, foi utilizada a fotodegradação de Rodamina B (RhB, P.A., Synth) sob luz visível. Em um processo usual, 50,0 mg das amostras foram adicionados a 50,0 mL de solução RhB ( $1 \times 10^{-5}$  mol/L). A solução foi colocada em ultrassom, para maior dispersão das partículas e deixada 30 min no escuro, sob agitação constante a 25°C, para equilíbrio adsorptivo molecular. Em seguida, as lâmpadas de luz visível (6x15 W, Philips TL-D) foram acesas e uma alíquota foi retirada após 30 min de irradiação. A alíquota foi analisada em espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis (espectrofotômetro V-660 (JASCO) e monitorando a diminuição do pico de RhB característico em 554 nm. O processo foi repetido mais quatro vezes, adicionando quantidades equivalentes de benzoquinona (BQ, Merck), oxalato de amônio (AO, 99,5 %, Aldrich),  $\text{AgNO}_3$  (99,8 %, Vetec) e álcool tert-butílico (TBA, 99 %, Aldrich) a cada ciclo, para identificar  $\text{OH}^*$ ,  $\text{O}_2^{\cdot -}$ ,  $e^-$  e  $\text{h}^+$  (FOGGI et al., 2017; TRENCH et al., 2018). De acordo com a inibição da eficiência fotocatalítica, as respectivas espécies reativas foram associadas.

### 3.3.6. Quantificação Intracelular de EROs

As células L929 e MB49 foram semeadas em placas de parede preta (Corning Incorporated, NY, EUA) nas mesmas condições descritas nos itens anteriores. As células foram inicialmente marcadas com 50  $\mu\text{L}$  (100  $\mu\text{M}$ ) de 2', 7' -diclorofluoresceína-DCF-DA diacetato (Sigma-Aldrich, EUA) por 30 min e mantidas no escuro. No intervalo de tempo de 100 minutos de exposição ao  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$  (0.12 mg/mL), uma cinética de quantificação de EROs foi realizada a cada 20 min. Uma solução de 10  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi utilizada como controle positivo para induzir o estresse oxidativo nas células. As leituras foram realizadas usando Spectra Max i3 (Molecular Devices) com excitação de 485-530 nm (PARRA-ROBERT et al., 2019).

### 3.3.7. Teste de Formação de Colônia

Células MB49 foram semeadas em placas de 6 poços na densidade de 300 células/mL. Neste ensaio, a menor concentração citotóxica de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$  (0.06 mg/mL) foi escolhida para analisar o mecanismo de inibição da formação de colônias. Após o período de 1 hora de exposição, as células foram lavadas com tampão PBS (1X) e o meio de cultura substituído por meio DMEM completo e as culturas mantidas nas mesmas condições por um

período de 5 dias. Posteriormente, as colônias resultantes foram lavadas cuidadosamente com tampão PBS (1X) e fixadas com metanol absoluto e coradas com cristal violeta 0.5% p/v por 5 minutos. As imagens das colônias foram analisadas em número e tamanho, por meio do software Image J (RAFEHI et al., 2011).

### 3.3.8. Ensaio de migração celular

As células MB49 foram semeadas em placas de 12 poços na concentração de  $5 \times 10^5$  células/poço. Para garantir que a variável proliferação não interferisse nos resultados, as células foram mantidas por 24 horas em meio DMEM suplementado com 1% de soro fetal bovino, a fim de manter todas as células no mesmo estágio de divisão celular. Em seguida, foi realizada um risco na porção central do poço, com o auxílio de uma ponteira de 200  $\mu$ L e os poços foram cuidadosamente lavados com PBS (1X) para remover fragmentos celulares e células sobrenadantes da área determinada. As células foram expostas ao  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$  por um período de 1 hora na concentração 0.06 mg/mL e, na sequência, o meio foi substituído por meio DMEM completo. As imagens foram capturadas em intervalos de 0 e 48 horas, com o auxílio de uma câmera fotográfica (CANON Powershot A650 IS 12.1 Megapixels Live Resolution) acoplada a um microscópio invertido (Carl Zeiss Primovert) (objetiva 20 X). A área de fechamento de risco devido à migração celular foi medida usando o software Image J e a porcentagem de fechamento área foi calculada comparando os tempos, usando uma fórmula reduzida abaixo. Os dados foram gerados usando o software GraphPad Prism 7.0 (YARROW et al., 2004; YUE et al., 2010).

$$(\%) \text{fechamento da área} = \frac{(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h})}{(A_{t=0h})} \times (100\%)$$

$A_{t=0h}$  medição da área listrada imediatamente após a determinação e

$A_{t=\Delta h}$  área listrada medida 48 horas após a incubação

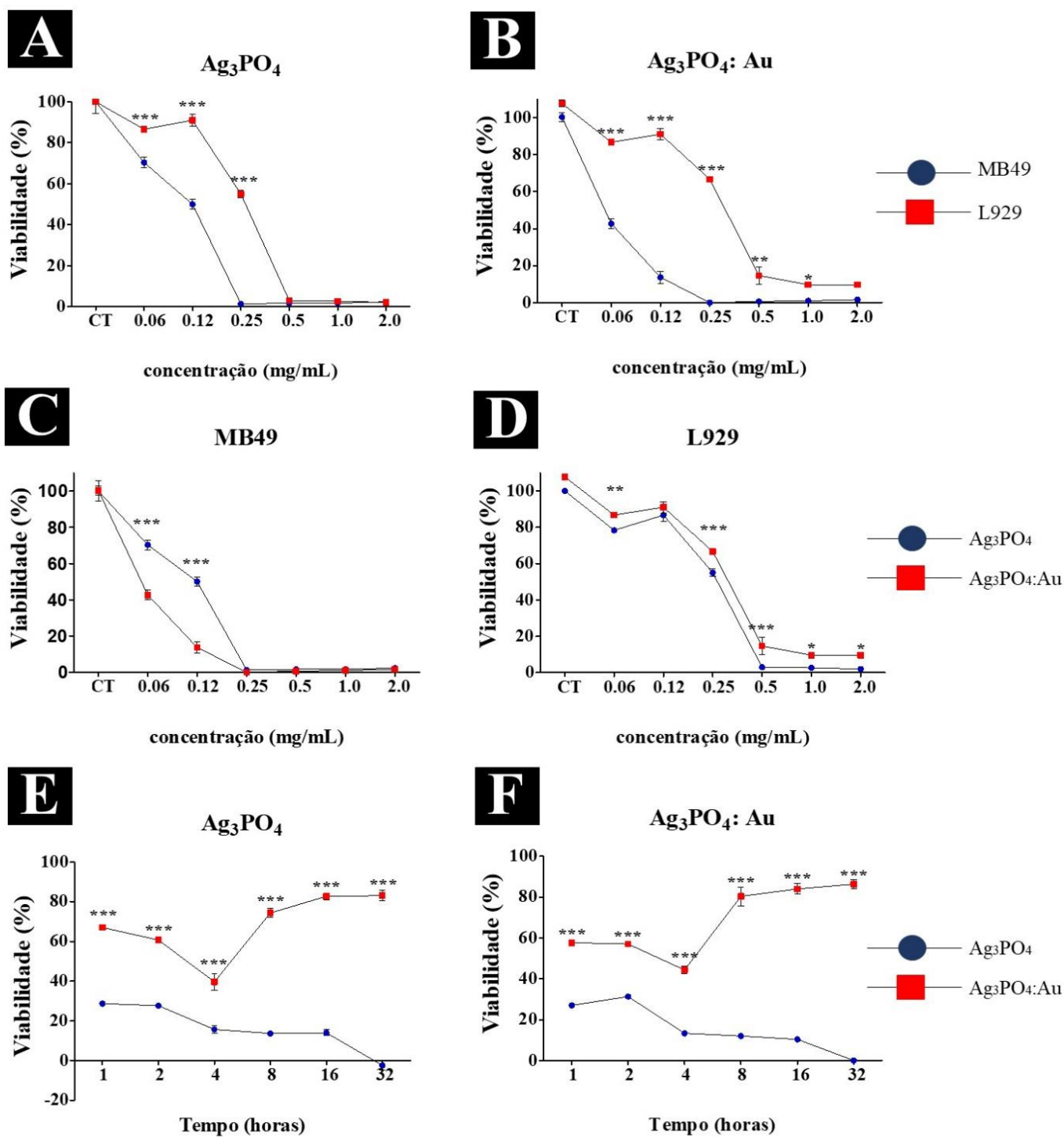
### 3.3.9. Análise estatística

Os dados quantitativos foram analisados com o teste estatístico ANOVA de um e dois fatores no programa Prism®, versão 5.0 (GraphPad Software), com análise post-hoc pelo teste de Dunnet ou Tukey. Os resultados foram expressos como um erro padrão da média (EPM). Nos casos em que os resultados não seguiram a normalidade, os dados foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn para comparações dois a dois. O software Prism®, versão 5.0 (GraphPad Software), foi utilizado para a realização das estatísticas e os valores de  $p < 0.05$  foram considerados significativos.

### 3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.4.1. A influência da concentração e do tempo de exposição de $Ag_3PO_4$ e $Ag_3PO_4: Au$ na viabilidade de células MB49 e L929

Neste estudo, a capacidade citotóxica de diferentes concentrações de  $Ag_3PO_4$  e  $Ag_3PO_4: Au$  foram determinadas após 24 horas de exposição às células tumorais (MB49) e células não tumorais (L929). Na **Figura 12**, foi possível observar um maior efeito citotóxico específico das NPs sobre as células tumorais, principalmente em relação ao  $Ag_3PO_4: Au$ . Quando as células foram expostas a uma concentração de 0.12 mg/mL de  $Ag_3PO_4$  a viabilidade das linhagens MB49 e L929 apresentaram valores de 50% e 91%, respectivamente (**Figura 12A**). Para a amostra  $Ag_3PO_4: Au$ , para a mesma concentração, a viabilidade celular foi de 13% para MB49 e 91% para L929 (**Figura 12B**). No entanto, quando as células foram expostas à ambas NPs na concentração de 0.12 mg/mL em diferentes tempos, a linhagem tumoral apresentou viabilidade celular abaixo de 40% e, nota-se ainda, o declínio gradual das taxas metabólicas tanto para  $Ag_3PO_4$  quanto para  $Ag_3PO_4: Au$  ao longo do tempo analisado (**Figuras 12E e 12F**). Por sua vez, para a célula não tumoral até o tempo de 4 horas de exposição, foi evidenciada uma diminuição significativa da viabilidade para ambas as NPs. Após esse período, é possível verificar que L929 apresentou um aumento expressivo de suas taxas de viabilidade celular até o final das 32 horas de análise (83 % para  $Ag_3PO_4$  e 86 % para  $Ag_3PO_4: Au$ ) (**Figuras 12E e 12F**). Essa distinção nas respostas de ambas as linhagens celulares para a exposição de  $Ag_3PO_4$  e  $Ag_3PO_4: Au$  (**Figuras 12C e 12D**), provavelmente tem relação com a resistência e adaptação ao estresse oxidativo em função da manutenção de um sistema antioxidante mais efetivo em células não tumorais (GOOSSENS et al., 1995; HUMPHREYS; WILSON, 1999).



**Figura 12:** Viabilidade de células MB49 e L929 expostas à diferentes concentrações de (A)  $Ag_3PO_4$  e (B)  $Ag_3PO_4: Au$ , por 24 horas; Comparação da viabilidade das células (C) MB49 e (D) L929, expostas a  $Ag_3PO_4$  e  $Ag_3PO_4: Au$ ; Viabilidade de células MB49 e L929 expostas ao (E)  $Ag_3PO_4$  e (F)  $Ag_3PO_4: Au$  na concentração de 0.12 mg/mL em diferentes tempos. Cada ponto representam os valores médios dos grupos e o erro padrão médio (SEM) da triplicata. As diferenças estatísticas foram estabelecidas pelo teste ANOVA de dois fatores com análise post-hoc usando o teste de Dunnett. Valores estatisticamente significativos:  $p < 0,001$  (\*\*\*). Fonte: Autoria própria.

### 3.4.2. Determinação do tipo de morte celular

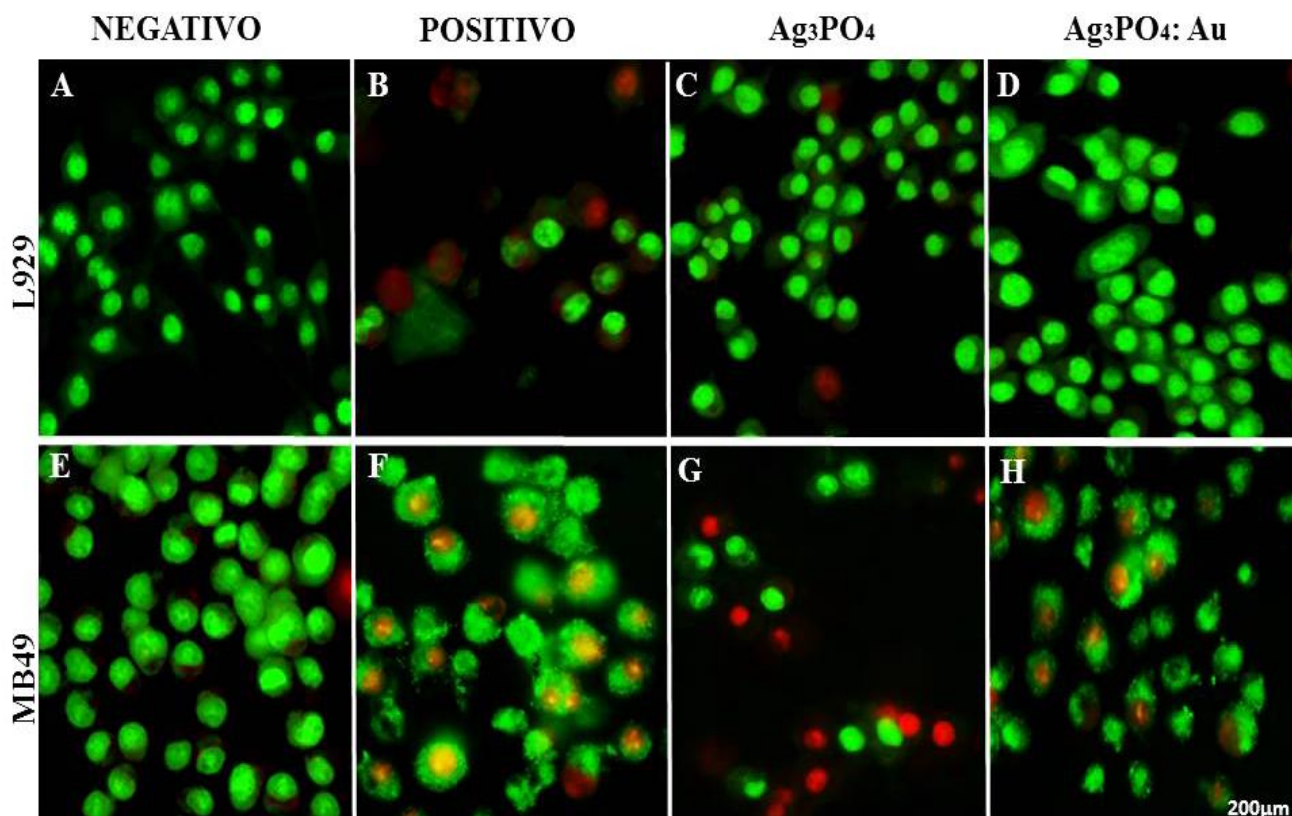
O uso de nanopartículas é descrito como desencadeador das duas principais vias de morte celular apoptótica, extrínseca e intrínseca, mas principalmente a última (SHVEDOVA; KAGAN; FADEEL, 2010). Frequentemente, após sua internalização, são detectados nos lisossomas, gerando disfunção, por induzir uma forte desestabilização em suas membranas (TEDESCO et al., 2010), que por sua vez pode desencadear a via de morte por apoptose (ČESEN et al., 2012; STERN et al., 2009). AuNPs têm se mostrado muito promissores, especialmente na terapia anticâncer (GAO et al., 2021; LIU et al., 2019; SURAPANENI; BASHIR; TIKOO, 2018). Estudos anteriores já demonstraram uma forte ligação entre as diferentes propriedades físico-químicas e seus respectivos efeitos biológicos e toxicológicos em cultura de células (LUKIANOVA-HLEB et al., 2012; SURAPANENI; BASHIR; TIKOO, 2018). Assim, a morte celular induzida por esse tipo de nanomaterial já foi relacionada principalmente ao estresse oxidativo, o qual provoca resposta inflamatória indesejável e possíveis danos ao material genético, que leva à morte por apoptose ou necrose (SUR et al., 2010).

Ao analisar o tipo específico de morte celular causado pela exposição de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$ , por meio do ensaio qualitativo utilizando os fluoróforos laranja de acridina e brometo de etídio, observamos diferenças nos parâmetros de cor, aspecto morfológico, bem como condensação nuclear. A **Figura 13** mostra que para a concentração que apresentou o melhor efeito citotóxico para ambos as NPs (0.12 mg/mL), o principal efeito causado em células MB49 foi a necrose, uma vez que a integridade da membrana celular foi perdida e o brometo de etídio foi capaz de migrar para o interior das células tumorais (**Figura 13G e 13H**). Esse resultado pode ser devido ao grande potencial do  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  em produzir agentes oxidantes e causar danos intracelulares severos. No entanto, uma ligeira quantidade de apoptose também foi provocada por ambas NPs nas células MB49 (**Figura 13**).

Porém, observando os resultados obtidos com a exposição de L929 ao  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$ , uma quantidade muito pequena foi relacionada à morte por apoptose e necrose, porém, há um predomínio de células viáveis (**Figuras 13C e 13D**). Este fato poderia explicar o diferente comportamento encontrado no ensaio de viabilidade celular em momentos distintos (**Figura 12E e 12F**), visto que nas primeiras horas de exposição a linhagem L929 apresentou decréscimo nas taxas metabólicas, o que pode ter sido causado inicialmente pela morte de um pequeno número de células. No entanto, o predomínio de células L929 viáveis mostradas na

**Figura 13C e 13D** provavelmente reflete o aumento nas taxas metabólicas encontradas em momentos posteriores, como mostrado na **Figura 12D**.

Em nosso trabalho, os dados corroboram com a maioria dos dados já publicados e dão fortes evidências de que os processos de apoptose em estágio tardio e necrose são desencadeados em células tumorais por meio da exposição de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$ .



**Figura 13:** Ensaio qualitativo de determinação de morte celular por marcação com os fluoróforos laranja de acridina (em verde) e brometo de etídio (em vermelho), após exposição a  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$  na concentração de 0.12 mg/mL por 1 hora. (A) Grupo controle de células viáveis da linhagem L929; (B) Grupo controle da linhagem L929 morto por apoptose e necrose (Camptotencina 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); (C) Células L929 tratadas com células  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ - predomínio de células que não mostraram morte celular; (D) Células L929 tratadas com  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$  - predomínio de células que não mostraram morte celular; (E) Grupo controle de células viáveis da linhagem MB49; (F) Grupo controle da linhagem MB49 morta por apoptose tardia (Camptotencina 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); (G) Células MB49 tratadas com células  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ - mostraram morte celular por necrose; (H) Células MB49 tratadas com  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$ - mostraram predominantemente morte celular por apoptose tardia. As imagens foram obtidas no aumento de 20X. Fonte: Autoria própria.

### 3.4.3. Determinação da Produção de EROS por $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ e $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$

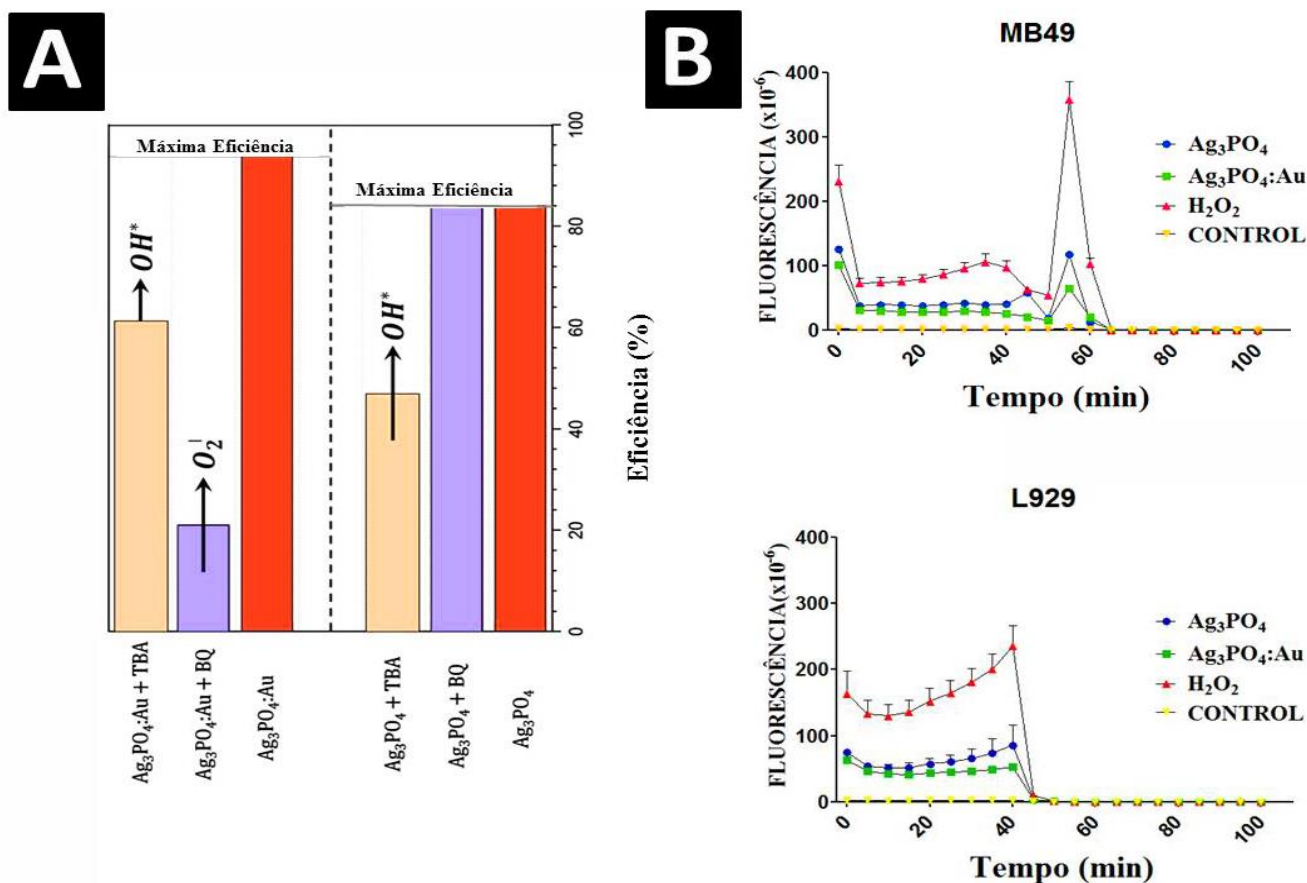
Em relação às propriedades citotóxicas das NPs, os efeitos têm sido associados principalmente à capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio, que causam alto estresse oxidativo e, conseqüentemente, provocam uma variedade de alterações intracelulares e ativam as principais vias de morte (BENDALE; BENDALE; PAUL, 2017; ZHANG et al., 2014). Em estudos anteriores, foi demonstrado que diferentes quantidades de EROs podem ser produzidas por diferentes tamanhos de NPs, uma vez que é proporcional à reatividade da área e, dependendo da magnitude, podem apresentar diferentes níveis de toxicidade e seletividade (AVALOS et al., 2014; HUSSAIN et al., 2009). Embora os mecanismos de geração de EROs sejam diferentes para cada tipo de NP, suas caracterizações físico-químicas são os principais indicadores para os tipos de respostas produzidas (SHVEDOVA et al., 2012).

A fim de propor um mecanismo para a atividade fotocatalítica e antitumoral das nanopartículas de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$ , o teste de captura de espécies reativas foi realizado conforme descrito anteriormente (OLIVEIRA et al., 2021; TRENCH et al., 2018). Como a fotodegradação de rodamina (RhB) ocorre por meio da formação de EROs, a inibição desse processo pela adição de necrófagos específicos fornece informações sobre essas espécies (SOARES DA SILVA et al., 2019). Nestes testes, benzoquinona (BQ) e álcool terc-butilíco (TBA) foram usados para capturar os radicais  $\text{O}_2'$  e  $\text{OH}^*$ , respectivamente.

Na **Figura 14A**,  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  apresenta eficiência de fotodegradação de 84%, permanecendo inalterado quando BQ foi adicionado como eliminador de  $\text{O}_2'$ . Porém, ao adicionar o TBA, observou-se uma redução da eficiência para 46%, indicando a formação do radical  $\text{OH}^*$ . Para  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$ , observa-se um aumento da eficiência para 94 % em relação ao  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ . Além disso, há diminuição da eficiência para TBA (60 %) e BQ (20 %), indicando a formação dos radicais  $\text{O}_2'$  e  $\text{OH}^*$ , respectivamente. Essa mudança se deve ao aumento da população de elétrons na banda de valência (VB) do  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  por meio da transferência de elétrons gerada por AuNPs (ASSIS et al., 2019b). Em geral, o efeito sinérgico entre efeito de ressonância plasmônica e a separação eficiente  $e'-h^*$  desempenha um papel importante na melhoria da atividade de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$ .



Ao impregnar a matriz de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  com AuNP, ocorre uma distorção estrutural deslocalizada sobre a amostra devido à interface criada (MONDEGO et al., 2017). O contato do AuNPs com a superfície do  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  resulta em um maior número de elétrons na banda de condução (CB), facilitando as atividades redox devido à menor recombinação elétron-buraco. Isso se deve ao treinamento de um campo elétrico local próximo à superfície do AuNPs (ASSIS et al., 2021). Na interface Au- $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ , o número de portadores de carga é maior devido ao campo elétrico gerado, aumentando o processo de separação de carga correspondente. Esses fatores combinados geram um aumento na quantidade de EROs produzidas pelo semiconductor, levando aos efeitos celulares observados.



**Figura 14.** (A) Comparação da degradação fotocatalítica de RhB de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{:Au}$  na presença dos capturadores TBA (identificando  $\text{OH}^*$ ) e BQ (identificando  $\text{O}_2^-$ ), sob irradiação de luz visível; (B) Cinética de quantificação de EROs intracelular por MB49 e L929, no intervalo de 0 a 100 min de exposição à  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{:Au}$ . As esferas representam os valores médios de EROs dos grupos em cada momento e o erro padrão médio (EPM) do triplicata. Fonte: Autoria própria.

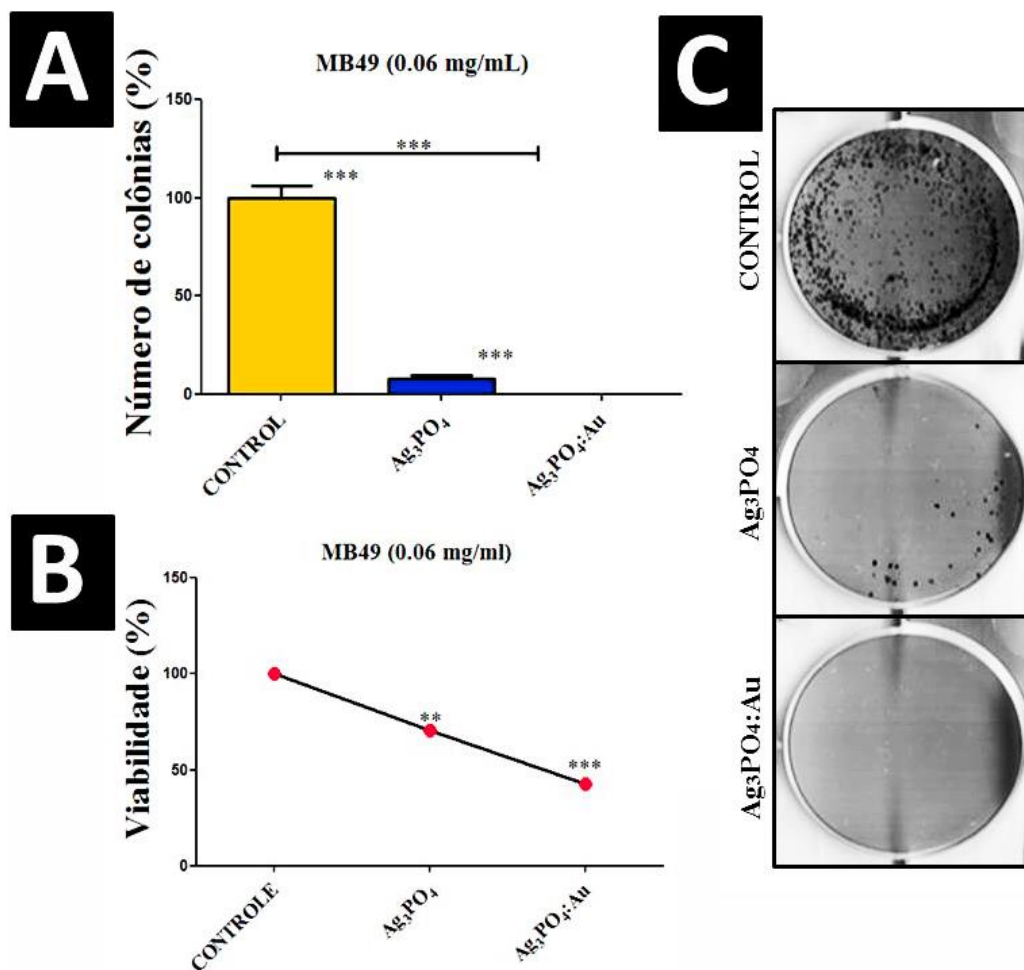
No processo biológico, a geração de EROs é o resultado do metabolismo do oxigênio, que dá origem às partículas altamente reativas. Esses processos metabólicos atuam como mediadores da transferência de elétrons, possibilitando a produção do trifosfato de adenosina (ATP). Por outro lado, o sistema de defesa antioxidante (enzimático e não enzimático) visa inibir e reduzir as emissões por ação deletéria dos radicais livres. Assim, quando a produção de EROs excede a capacidade de ação antioxidante, gerando um desequilíbrio, ocorre o estresse oxidativo (KELTS et al., 2015). Este estresse oxidativo, por sua vez, pode danificar organelas celulares, DNA, lipídios e proteínas, causando morte celular (CLARKSON; THOMPSON, 2000; NEL et al., 2006; ORRENIUS; NICOTERA; ZHIVOTOVSKY, 2010).

Para tanto, EROs intracelulares foram quantificados em células MB49 e L929 após exposição ao  $Ag_3PO_4$  e  $Ag_3PO_4: Au$  durante o intervalo de 100 min. De acordo com os dados apresentados na **Figura 14B**, não foram encontradas diferenças significativas em relação às quantidades de EROs para as células tumorais e não tumorais durante o tempo determinado. Porém, é possível notar que para L929, após 45 min, as células apresentaram uma quantidade de EROs equivalente ao grupo não tratado (**Figura 14B**), o que pode ser entendido como o restabelecimento da homeostasia ao estresse oxidativo, uma vez que para o respectivo período, a linhagem apresentou valores significativamente altos em relação à metabolização (**Figura 12**) e resistência celular (**Figura 13 C e 13D**). Embora MB49 apresente o mesmo declínio nas quantidades de EROs no tempo de 65 min, o mesmo não pode ser afirmado, pois a partir de 1 hora após a exposição às NPs, as células tumorais apresentaram diminuição expressiva da sua taxa de metabolização (**Figura 12**), o que foi confirmado no ensaio de morte celular (**Figura 13G e 13H**). O fato de células não tumorais apresentarem melhora nos valores de viabilidade em relação às células tumorais, sugere que o sistema enzimático antioxidante pode ser mais eficiente em células saudáveis do que em células neoplásicas, por algum mecanismo molecular contra os danos causados pela exposição ao  $Ag_3PO_4$  e  $Ag_3PO_4: Au$ . O pico de fluorescência observado a partir dos 50 minutos de DCFDA na linhagem MB49 provavelmente corresponde à liberação de citocromo C e ativação da via de morte por apoptose (CAIRNS; HARRIS; MAK, 1998; GOODSELL, 2004)

#### 3.4.4. Efeito de $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ e $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$ na capacidade clonogênica e migratória de células MB49

Estudos anteriores mostraram que o tratamento com AuNPs podem ser candidato promissor contra o crescimento do tumor e metástase (LIU et al., 2019), que é o processo pelo qual as células tumorais têm a capacidade de se desprender do tumor primário, mover-se para locais distantes (GONCIAR et al., 2019), seguindo a formação de uma massa macro-metastática por processo de proliferação celular (FIDLER, 2003; GUPTA; MASSAGUÉ, 2006). Tsai et al., mostraram que o uso de AuNPs inibiu a proliferação de células tumorais ovarianas e promoveu a ativação da cascata de morte celular apoptótica de células leucêmicas (TSAI et al., 2011). Além disso, essas partículas também foram relatadas recentemente para inibir a metástase de uma variedade de tipos de células tumorais, bem como a produção de EROs após exposição a curto prazo (SHANMUGASUNDARAM et al., 2017).

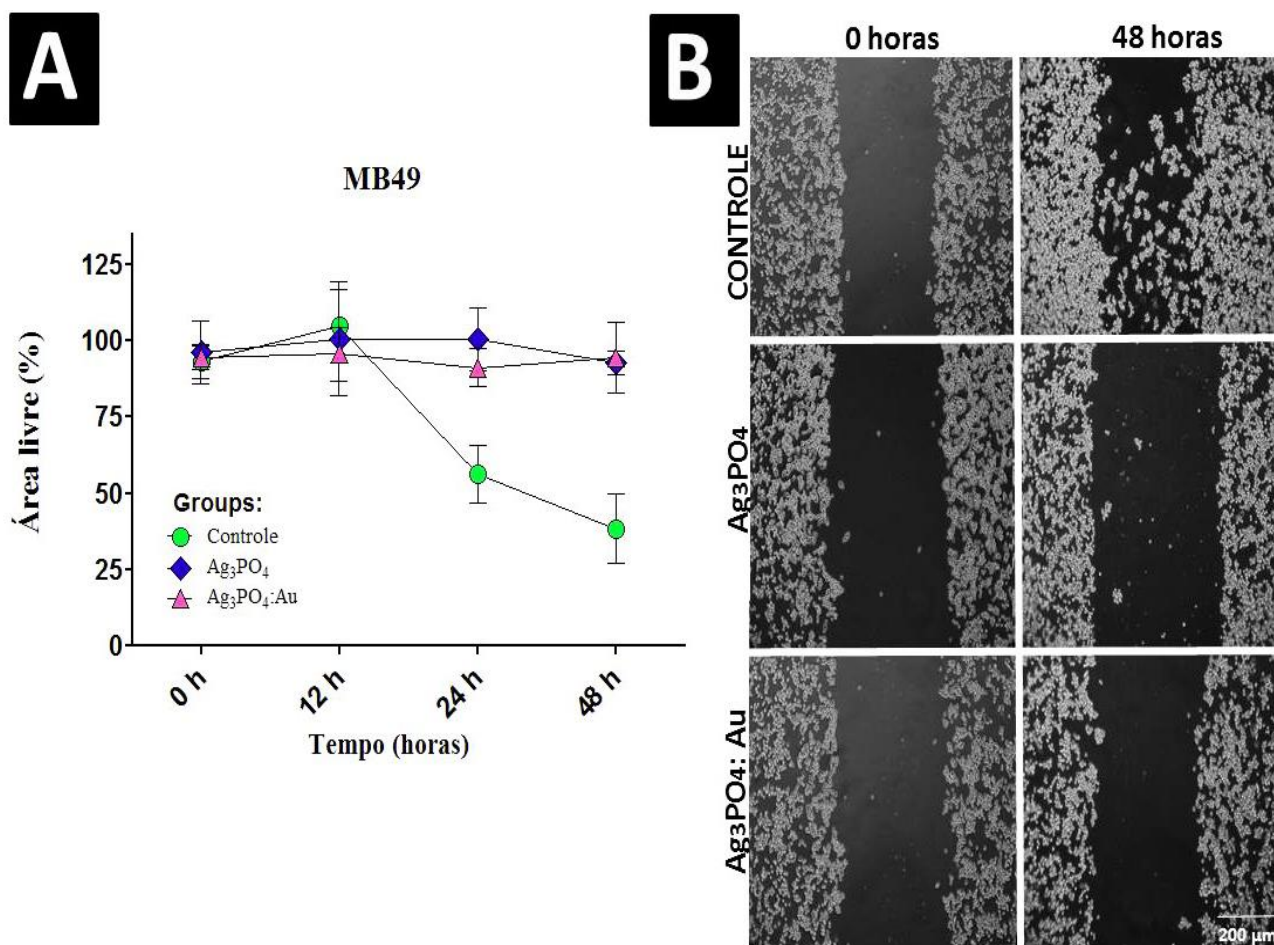
Assim, considerando que o tempo de 1 hora foi suficiente para a detecção de altas quantidades de EROs intracelular e reduzir drasticamente a viabilidade das células tumorais em relação às células não tumorais, para verificar a capacidade de proliferação e migração das células MB49, as células foram expostas pelo respectivo período ao  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$  na concentração 0.06 mg/ml. A **Figura 15A e 15C** mostram que, nos 5 dias seguintes à exposição as NPs, as células tumorais apresentaram inibição significativa da capacidade de formar colônias, principalmente para  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$ . Ao mesmo tempo, demonstramos que esse resultado é condizente com os níveis de metabolização celular, uma vez que para a mesma concentração, nossos resultados apresentaram diminuição da viabilidade celular (**Figura 15B**). Este resultado é uma evidência de que, além de provocar a morte de células tumorais,  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  e  $\text{Ag}_3\text{PO}_4:\text{Au}$  podem ter ação efetiva na manutenção da inibição do crescimento tumoral em concentrações abaixo da citotóxica.



**Figura 15.** Efeito de Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:Au na formação de colônias de células MB49. (A) Gráfico do número de colônias normalizadas em relação ao controle (n = 3). As colunas representam os valores médios dos grupos e o erro padrão médio (EPM). As diferenças estatísticas foram feitas usando o teste Anova de dois fatores com análise post-hoc usando o teste de Dunnett. (\*\*\*) Valores estatísticos com p < 0,001; (B) Viabilidade das células referente ao ensaio de formação de colônias após 5 dias da exposição; (C) A imagem corresponde ao ensaio de formação de colônia de uma réplica representativa de três experimentos independentes cultivados por 5 dias após a exposição. Fonte: Autoria própria.

Ainda na **Figura 16**, Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:Au demonstraram potencial antimigratório quando comparado ao grupo controle, uma vez que, após 48 horas de exposição, o grupo não tratado apresentou grupamentos celulares na área demarcada, diferente do que foi encontrado para os grupos expostos às NPs, indicando uma possível inibição da capacidade das células tumorais de invadir a área determinada no ensaio (**Figura 16C e 16D**). Esses dados sugerem que os NPs podem não apenas ser seletivamente tóxicos para as células do câncer de bexiga em

concentrações mais altas, mas também controlar seus possíveis mecanismos migratórios em concentrações mais baixas.



**Figura 16.** Efeito de Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:Au na formação de colônias de células MB49. (A) Gráfico da medida de área livre medido após os respectivos períodos de análise. As linhas representam a média ± SEM medições da área de célula relativa ao longo dos quatro intervalos de tempo e o erro padrão médio (EPM). As diferenças estatísticas foram feitas usando o teste Anova de dois fatores com análise post-hoc usando o teste de Dunnett. (\*\*\*) Valores estatisticamente comprometidos com p < 0,001. (B) Imagem correspondente ao teste de migração de uma réplica representativa de três experimentos independentes e analisada após 0, 12, 24 e 48 horas de exposição (n = 3). A imagem corresponde a uma réplica representativa de três experimentos independentes. Imagens com ampliação de 20X. Fonte: Autoria própria.

### 3.5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, demonstramos que  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  apresenta alto grau de toxicidade, principalmente sobre células de tumor de bexiga, em comparação com células não-tumorais. A decoração de  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  com nanopartículas de Au mostrou ser capaz de aumentar seletividade tumoral e controlar os processos metastáticos sem comprometer a eficiência antitumoral das nanopartículas *in vitro*.

# **CAPÍTULO 3**

**Dióxido de titânio modificado como potencial fotossensibilizador ativado  
por luz visível para tratamento de câncer de bexiga**

## RESUMO

A baixa concentração de oxigênio dentro do microambiente tumoral representa uma barreira importante para a terapia fotodinâmica de muitos tumores malignos, especialmente o câncer de bexiga urotelial. Nesse contexto, o dióxido de titânio, que tem baixo custo e pode gerar altos níveis de EROs independentemente das concentrações locais de  $O_2$ , poderia ser um tipo potencial de fotossensibilizador para o tratamento desse tipo de câncer. No entanto, o uso de UV pode ser uma grande desvantagem, pois promove a quebra das ligações químicas da molécula de DNA em tecidos normais. No presente estudo, focamos nas atividades citotóxicas de um novo material ( $Ti(OH)_4$ ) capaz de absorver luz visível e produzir grandes quantidades de EROs. Usamos a linha celular de bexiga maligna MB49 para avaliar os efeitos de múltiplas concentrações de  $Ti(OH)_4$  na citotoxicidade, proliferação, migração e produção de EROs. Além disso, os mecanismos de morte celular foram investigados usando FACS, acúmulo de vacúolos ácidos lisossomais, atividade da caspase-3 e ensaios de potencial elétrico mitocondrial. Os resultados mostraram que a exposição de  $Ti(OH)_4$  à luz visível estimula a produção de EROs e causa necrose dose-dependente em células tumorais. Além disso, o  $Ti(OH)_4$  foi capaz de inibir a proliferação e migração de MB49 em baixas concentrações. Um aumento no potencial de membrana mitocondrial associado ao acúmulo de lisossomos ácidos e baixa atividade da caspase-3 sugere que a morte celular do tipo II pode ser iniciada por mecanismos de disfunção autofágica associados à alta produção de EROs. Em conclusão, as características do  $Ti(OH)_4$  o tornam um fotossensibilizador potencial contra o câncer de bexiga.



## **ABSTRACT**

Low oxygen concentration inside the tumor microenvironment represents a major barrier for photodynamic therapy of many malignant tumors, especially urothelial bladder cancer. In this context, titanium dioxide, which has a low cost and can generate high ROS levels regardless of local O<sub>2</sub> concentrations, could be a potential type of photosensitizer for treating this type of cancer. However, the use of UV can be a major disadvantage since it promotes breakage of the chemical bonds of the DNA molecule on normal tissues. In the present study, we focused on the cytotoxic activities of a new material (Ti(OH)<sub>4</sub>) capable of absorbing visible light and producing high amounts of ROS. We used the malignant bladder cell line MB49 to evaluate the effects of multiple concentrations of Ti(OH)<sub>4</sub> on the cytotoxicity, proliferation, migration, and production of ROS. In addition, the mechanisms of cell death were investigated using FACS, accumulation of lysosomal acid vacuoles, caspase-3 activity and mitochondrial electrical potential assays. The results showed that exposure of Ti(OH)<sub>4</sub> to visible light stimulates the production of ROS and causes dose-dependent necrosis in tumor cells. Besides, Ti(OH)<sub>4</sub> was capable of inhibiting the proliferation and migration of MB49 in low concentrations. An increase in the mitochondrial membrane potential associated with the accumulation of acid lysosomes and low caspase-3 activity suggests that type II cell death could be initiated by autophagic dysfunction mechanisms associated with high ROS production. In conclusion, the characteristics of Ti(OH)<sub>4</sub> makes it a potential photosensitizer against bladder cancer.

## 4.1.INTRODUÇÃO

Dentre os tratamentos atuais, a terapia fotodinâmica (PDT) costuma ser menos invasiva do que qualquer opção cirúrgica. Baseia-se na ação antitumoral de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SONG et al., 2020) produzidas a partir da irradiação de fotossensibilizadores (PSs) por um comprimento de onda específico de luz na presença de oxigênio molecular (CALIXTO et al., 2016; WU et al., 2020). PS inorgânico geralmente tem maior eficiência na conversão de luz em produção de ROS quando comparado com PS orgânicos. Ainda assim, alguns estudos também demonstram que PS inorgânicos pode ser direcionados aos tecidos-alvo, o que representa uma grande vantagem em seu uso para a terapia fotodinâmica (ZHOU et al., 2021).

No entanto, para muitos tumores malignos, e especialmente para CUB, a baixa concentração de oxigênio no interior da bexiga e no microambiente tumoral representa uma grande barreira para PDT (LIANG et al., 2020; RAILKAR; AGARWAL, 2018). O estabelecimento de hipóxia é uma ocorrência comum em muitas neoplasias sólidas como mama, ovário, cabeça e pescoço (WYKOFF et al., 2000), incluindo o câncer de bexiga. Turner et al., (2002) demonstraram a alta expressão de um marcador de hipóxia, a anidrase carbônica 9 (CA IX), em regiões de tumores de bexiga superficiais e invasivos. Sua expressão foi mais intensa na superfície luminal dos tumores, indicando a presença de hipóxia crônica (TURNER et al., 2002). Portanto, PSs inovadores para a produção de EROs, que não dependem da concentração local de oxigênio molecular, podem aumentar a atividade de PDT em tratamentos para CUB.

Para células de mamíferos em condições fisiológicas, o dióxido de titânio branco convencional ( $\text{TiO}_2$ ) é um material atóxico (WYKOFF et al., 2000), estável e de baixo custo (WU et al., 2020) que apresenta propriedades fotodinâmicas promissoras para o tratamento do câncer (TURNER et al., 2002). No entanto, assim como um semicondutor do tipo n com alto valor de band gap de 3,2 eV, o  $\text{TiO}_2$  tende a produzir uma quantidade maior de ROS quando exposto aos menores comprimento de onda com a luz ultravioleta (245 nm) (FABIAN et al., 2008; MOOSAVI et al., 2016), que em função do potencial mutagênico poderia ter sua aplicação em PDT restrita (NOGUEIRA et al., 2018).

Esforçando-se para superar essas limitações, nossa equipe desenvolveu um PS com nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  decorado com grupos peróxidos (denominado como  $\text{Ti}(\text{OH})_4$ ). A ligação covalente desses grupos de peróxidos à superfície das nanopartículas desloca o band gap para cerca de 2,3 eV (NOGUEIRA et al., 2018; RIBEIRO et al., 2019), permitindo assim que o

Ti(OH)<sub>4</sub> absorva a luz visível e apresente atividade fotocatalítica equivalente quando exposto à luz UV e cerca de 90% maior se comparado com o TiO<sub>2</sub> comum, Além disso, foi demonstrado que o contato do Ti(OH)<sub>4</sub> com a água pode produzir radicais OH\* mesmo após vários ciclos de fotodegradação (NOGUEIRA et al., 2018). Portanto, o uso de Ti(OH)<sub>4</sub> para tratar o câncer de bexiga não invasivo muscular pode ser extremamente vantajoso em comparação com PS usado até agora.

Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo demonstrar os efeitos citotóxicos do Ti(OH)<sub>4</sub> e identificar os principais mecanismos de ação de PDT com base no uso de Ti(OH)<sub>4</sub> como PS ativado por luz visível em célula de tumor de bexiga da linhagem MB49.

## 4.2. OBJETIVOS

### 4.2.1. OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve como objetivo determinar os efeitos citotóxicos do  $Ti(OH)_4$  e identificar os principais mecanismos de ação da PDT a partir da utilização do  $Ti(OH)_4$  como PS ativado por luz visível em uma célula de câncer de bexiga (MB49).

### 4.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para avaliar a atividade citotóxica e os prováveis mecanismos que levam a morte de células tumorais pela terapia fotodinâmica a partir da utilização do  $Ti(OH)_4$ , temos:

- Síntese de  $Ti(OH)_4$ ;
- Análise citotóxica de  $Ti(OH)_4$  ativado por luz visível e não ativado em células MB49 e L929;
- Análise citotóxica de  $Ti(OH)_4$  ativado por luz visível e exposto por 12 e 24 horas no escuro em MB49 e L929;
- Mensuração da produção de EROs por  $Ti(OH)_4$ ;
- Quantificação de EROs intracelular em MB49;
- Análise citotóxica de  $Ti(OH)_4$  ativado por luz visível em três doses subsequentes em células MB49;
- Análise do efeito de  $Ti(OH)_4$  na proliferação e migração de células MB49;
- Análise do efeito de  $Ti(OH)_4$  no tipo de morte de células MB49 e os possíveis mecanismos (mitocondriais e lisossomais).

### 4.3.MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.3.1. Síntese de Ti(OH)<sub>4</sub>

O Ti(OH)<sub>4</sub> foi sintetizado pelo método do peroxo oxidante (OPM), uma rota química úmida que permite que átomos de titânio na superfície se liguem a dois átomos de oxigênio, formando um grupo peróxido, que dá sua cor amarela (NOGUEIRA et al., 2018). Neste método, 3 mL de isopropóxido de titânio foram adicionados a 40 mL de peróxido de hidrogênio e aquecidos a 80°C para formar um gel amarelo. O gel foi seco a 60°C por 24 horas para formar pó de Ti(OH)<sub>4</sub>. O pó de Ti(OH)<sub>4</sub> obtido apresentou tamanho médio de 5 nm. O material apresentava uma fina camada (até 8%) de grupos peróxidos em relação à massa total, e um band gap de 2,3 eV, o que permitiu sua ativação pela luz visível (FRANCATTO et al., 2016; RIBEIRO et al., 2019).

#### 4.3.2. Identificação EROs produzida por Ti (OH)<sub>4</sub>

Para a identificação de EROs, foi utilizada a fotodegradação de Rodamina B (RhB, P.A., Synth) sob luz visível. Em um processo usual, 50,0 mg de Ti(OH)<sub>4</sub> foram adicionados a 50,0 mL de solução RhB (1x10<sup>-5</sup> mol/L). A solução foi colocada em ultrassom, para maior dispersão das partículas e deixada 30 min no escuro, sob agitação constante a 25 °C, para equilíbrio adsorptivo molecular. Em seguida, as lâmpadas de luz visível (6x15W, Philips TL-D) foram acesas e uma alíquota foi retirada após 30 min de irradiação. A alíquota foi analisada em espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis (espectrofotômetro V-660 (JASCO)) monitorando a diminuição do pico de RhB característico em 554 nm. O processo foi repetido mais quatro vezes, adicionando-se Álcool Tert-butílico (TBA, 99%, Aldrich) para identificar OH\* (FOGGI et al., 2017). De acordo com a inibição da eficiência fotocatalítica, o processo está associado a produção de espécies reativas.

#### 4.3.3. Culturas de células L929 e MB49

Fibroblastos murinos (L929) e carcinoma urotelial de bexiga murino (MB49), foram cultivadas em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) com alta concentração de glicose e 2 mmol/L de L-glutamina (Cultilab, Campinas, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab) e 1% de penicilina + estreptomicina (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brasil) (DMEM completo) em incubadora a 37°C, com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.3.4. Viabilidade celular na exposição ao Ti(OH)<sub>4</sub> na ausência e na exposição à luz visível

As células L929 e MB49 foram semeadas em placas de cultura de 96 poços (Corning, NY, EUA) a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço em um meio de cultura DMEM completo e deixadas aderir. As células foram expostas a uma suspensão de Ti(OH)<sub>4</sub> nas seguintes concentrações: 10.0; 5.0; 1.0; 0.5 e 0.25 mg/mL, em conjunto com um controle negativo composto por células não tratadas. Uma das placas contendo células e Ti(OH)<sub>4</sub> foi mantida incubada no escuro por todo o período experimental para investigar a ação do Ti(OH)<sub>4</sub> inativado. Uma segunda placa foi colocada por 1 hora em uma caixa (10,5x22x23cm) contendo uma fonte de luz visível projetada para ativar o Ti(OH)<sub>4</sub> (LED branco de energia 12W, 1170 lumens, temperatura de cor de 6000k a uma distância de irradiação de 15 cm), que liberou cerca de 5,16 mW/cm<sup>2</sup> de energia na linhagem de cultivo celular, medida pelo equipamento (PM20HC- ThorLabs, EUA). Essa energia foi distribuída por fótons com comprimento de onda entre 400 e 750 nm, contendo dois picos (440 e 550 nm) e um vale em 475 nm (**Figura 1A**). Como as placas de cultura de células são feitas de plástico sem capacidade de refletância, foram colocadas em uma caixa fechada com as paredes laterais e o fundo cobertos com material reflexivo.

Após este procedimento, ambas as placas foram incubadas no escuro por 12 e 24 horas, e as células resultantes foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X). O teste de viabilidade celular foi realizado adicionando 200 µL/poço de Resazurina (solução 70 µmol/ L, Sigma-Aldrich, EUA) em PBS 1X. A absorvância foi medida em um espectrofotômetro com comprimentos de onda de 570 e 600 nm (BORRA et al., 2009).

#### 4.3.5. Ensaio de quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular

As células MB49 foram semeadas em placas de parede preta de 96 poços (Corning, NY, EUA) a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço e expostas a um meio completo com  $\text{Ti}(\text{OH})_4$  ativado por 1 hora com luz visível. Uma solução de 10  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi utilizada (30 min de exposição) como controle positivo para induzir o estresse oxidativo nas células. As células sem qualquer tratamento foram utilizadas como controle negativo. Após o período de exposição de 2 horas, as células foram lavadas com PBS (1X) e marcadas com 30  $\mu\text{L}$  de uma solução 100  $\mu\text{mol/L}$  de 2', 7' diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) (Sigma-Aldrich, EUA). As leituras de fluorescência foram feitas usando Spectra Max i3 (Molecular Devices), com excitação de 485-530 nm (PARRA-ROBERT et al., 2019)

#### 4.3.6. Viabilidade das células MB49 em relação à reexposição ao $\text{Ti}(\text{OH})_4$ ativado

As células MB49 foram submetidas a três designs de exposição (1, 2 ou 3 doses) para as seguintes concentrações diferentes, para avaliar os efeitos da reexposição ao  $\text{Ti}(\text{OH})_4$  ativado (1 hora): 10.0; 5.0; 1.0; 0.5; 0,1 mg/mL, de acordo com os seguintes protocolos. DESENHO 1: exposição de uma dose e quantificação da viabilidade após 12 horas; DESENHO 2: exposições de duas doses com intervalos intermediários de cultivo de 12 horas e quantificação da viabilidade após 24 horas; DESENHO 3: exposições de três doses com intervalos intermediários de cultivo de 12 horas e quantificação da viabilidade após 36 horas. As células foram lavadas com PBS (1X) antes de cada reexposição e um meio composto recém-ativado foi reintroduzido.

#### 4.3.7. Efeito na capacidade clonogênica das células MB49 em relação à reexposição ao $\text{Ti}(\text{OH})_4$ ativado

As células MB49 foram semeadas em placas de 6 poços (Corning, NY, EUA) a uma concentração de 300 células/poço, nas mesmas condições de incubação que o experimento descrito em 3.6, exceto que as células foram lavadas com PBS (1X), e mantidos em meio de cultura DMEM completo por 5 dias após os respectivos períodos de exposição ao  $\text{Ti}(\text{OH})_4$ . Neste ensaio, uma concentração não citotóxica (6,0  $\mu\text{g/mL}$ ) que inibiu a proliferação sem causar morte celular definida foi escolhida para analisar o mecanismo de inibição da formação de colônias. Este procedimento foi otimizado em testes anteriores. As células resultantes foram fixadas em metanol absoluto e coradas com 0,1% de violeta de cristal (Corning, NY, EUA). As imagens digitalizadas das colônias foram analisadas usando o software ImageJ (RAFEHI et al., 2011).

#### 4.3.8. Efeito do Ti(OH)<sub>4</sub> ativado na migração celular avaliada pelo ensaio de fechamento de risco (Would Healing Assay)

As células MB49 foram semeadas em placas de 12 poços (Corning, NY, EUA) a uma concentração de  $5 \times 10^5$  células/poço e mantidas por 24 horas em DMEM suplementado com 1% de FBS para garantir que a proliferação variável não interferisse nos resultados. Foi realizada uma raspagem na porção central do poço com ponteira de 200  $\mu$ L e régua estéril. Em seguida, as células foram cuidadosamente lavadas com PBS para remover os resíduos celulares da área arranhada. As células foram tratadas com 3 doses de Ti(OH)<sub>4</sub> na concentração de 6.0  $\mu$ g/mL, conforme descrito no item 3.6. As imagens foram capturadas após 12, 24 e 48 horas com um microscópio invertido acoplado a um sistema de captura de imagens. A área de fechamento por migração celular foi medida com o software ImageJ (YARROW et al., 2004; YUE et al., 2010).

$$(\%) \text{ fechamento da área} = \frac{(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h})}{(A_{t=0h})} \times (100\%)$$

$A_{t=0h}$  medição da área listrada imediatamente após a determinação e

$A_{t=\Delta h}$  área listrada medida em 12, 24 ou 48 horas após a incubação.

#### 4.3.9. Caracterização da morte celular após tratamento com Ti(OH)<sub>4</sub> ativado

##### 4.3.9.1. Identificação do tipo de morte celular

As células MB49 foram semeadas em placas de 12 poços (Corning, NY, EUA) e tratadas com Ti(OH)<sub>4</sub> ativado, na concentração de 0.5 mg/mL, concentração que melhor representou a quantificação intracelular de EROs, e o ensaio de viabilidade celular. Uma alíquota de 10  $\mu$ mol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 horas de exposição) foi usada como controle positivo, e uma cultura sem nenhum tratamento, como controle negativo. Após a aplicação do tratamento de 3 doses de Ti(OH)<sub>4</sub> como descrito no item 3.6, as células foram centrifugadas a 320xg por 10 minutos a 4 °C, cuidadosamente lavadas com PBS (1X) e suspensas em 200  $\mu$ L de tampão de ligação. Em seguida, foram desprendidas da placa e transferidos para microtubos, os quais foram incubados



em temperatura ambiente com 1  $\mu\text{L}$  de anexina-V e 1  $\mu\text{L}$  do Kit de Detecção 7-AAD (BD Biosciences) por 15 minutos no escuro. As amostras foram centrifugadas a 320xg por 10 minutos a 4°C, e as soluções com os corantes foram cuidadosamente descartadas. As células foram então suspensas em 300  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação 1X. O FACS foi realizado por um citômetro BD Accuri™ C7 (BD Biosciences), e os gráficos de pontos biparamétricos foram analisados usando um programa de software FCS Express (De Novo Software™) (COSSARIZZA et al., 2017).

#### 4.3.9.2. Quantificação Lisossomal

Para quantificar o acúmulo de vesículas ácidas lisossomais, células MB49 foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL. Após exposição com 1 dose de  $\text{Ti}(\text{OH})_4$  a uma concentração de 6.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 12 horas, as células foram lavadas com PBS (1X) e expostas a uma solução de vermelho neutro (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de vermelho neutro em DMEM a 1% FBS) (Sigma-Aldrich, EUA) a 37 °C, 5% de  $\text{CO}_2$  por 2 horas. As células foram lavadas com PBS (1X) e o vermelho neutro retido no interior dos lisossomos foi eluído em uma solução de etanol (50% v/v) e ácido acético (1% v/v) por 10 minutos. A medição da incorporação lisossomotrófica foi estimada usando um espectrofotômetro com uma faixa de comprimento de onda de 540 a 800 nm. Os valores de absorção foram convertidos em índices relativos usando os controles positivo (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 30 min) e negativo (meio de cultura). A estimativa da morte celular do tipo II foi obtida aplicando-se o índice unitário de excesso de vesículas ácidas ( $\text{AAU} > 1$ ), calculado dividindo a retenção média relativa de vermelho neutro pela viabilidade celular relativa quantificada pelo ensaio de Resazurina, realizado em paralelo (MARTINS et al., 2013)

Qualitativamente, o excesso de lisossomos tardios foi verificado marcando-os com fluoróforo laranja de acridina, uma vez que a acidez citoplasmática transforma o fluoróforo verde em vermelho. Portanto, o processo foi realizado semeando células MB49 em lamínulas colocadas em placas de 6 poços na concentração de  $1 \times 10^4$  células/mL, seguido de tratamento com 1 dose de  $\text{Ti}(\text{OH})_4$  na concentração de 6.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Uma solução de 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2 horas de exposição) foi usada como controle positivo e uma cultura não tratada como controle negativo. Após o período de exposição, as células foram lavadas com PBS (1X) e coradas com 50  $\mu\text{L}$  (1 mg/mL) de fluoróforo laranja de acridina (Sigma-Aldrich, EUA) por 15 minutos na ausência de luz. As células foram lavadas e lamínulas foram montadas em lâminas para

observação em um microscópio de fluorescência. As imagens foram capturadas com ampliação de 40X (THOMÉ et al., 2016)

#### 4.3.9.3. Quantificação do Potencial Elétrico Mitocondrial

As células MB49 foram semeadas em placas de 6 poços contendo lamínulas no fundo do poço para adesão celular, a uma concentração de  $1 \times 10^4$  células/ mL, e tratadas com 1 dose de  $Ti(OH)_4$  a uma concentração de  $6.0 \mu\text{g/mL}$ . As células foram então lavadas com DMEM e  $50 \mu\text{L}$  ( $1 \text{ mg/mL}$  em etanol) de solução de Rodamina 123 (Sigma-Aldrich, EUA) foram adicionados por 15 minutos no escuro, a  $37^\circ\text{C}$ . Em seguida, as células foram lavadas com PBS (1X) e as lamínulas colocadas em lâminas para observação em microscópio de fluorescência. As imagens foram capturadas com ampliação de 40X e analisadas com um programa de software Image J (SCADUTO; GROTYOHANN, 1999).

#### 4.3.9.4. Atividade da enzima caspase-3

As células MB49 foram semeadas em placas de 6 poços a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL e tratadas com 1 dose de  $Ti(OH)_4$  a uma concentração de  $6.0 \mu\text{g/mL}$ . O ensaio de quantificação da atividade enzimática da caspase-3 foi realizado com a aplicação do kit EnzChek® Caspase-3 (E-13183-Molecular Probe, Leiden, Holanda), e o protocolo seguiu as orientações do fabricante. As medições de fluorescência foram realizadas usando Spectra Max i3 (Molecular Devices)  $342/441 \text{ nm}$  de excitação/emissão (FUJITA et al., 1998).

#### 4.3.10. Análise estatística

Os dados quantitativos foram analisados com o teste estatístico ANOVA de um e dois fatores no programa Prism®, versão 5.0 (GraphPad Software), com análise post-hoc pelo teste de Dunnet ou Tukey. Os resultados foram expressos como um erro padrão da média (EPM). Nos casos em que os resultados não seguirem a normalidade, os dados foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn para comparações dois a dois. O software Prism®, versão 5.0 (GraphPad Software), foi utilizado para a realização das estatísticas e os valores de  $p < 0.05$  foram considerados significativos.

## 4.4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.4.1. Influência do tempo de contato e ativação do $Ti(OH)_4$ na viabilidade das células MB49

Embora PDT seja uma das terapias menos invasivas, ainda representa um desafio no tratamento de certos tipos de neoplasias malignas (GESO, 2013) com baixa disponibilidade local de oxigênio (YOU et al., 2016). O desenvolvimento de uma nova classe de PS que possa exercer um efeito antitumoral independente de oxigênio poderia aumentar a eficácia de PDT (FRANCATTO et al., 2016; TURNER et al., 2002). As propriedades fotocatalíticas do  $TiO_2$  convencional o tornam amplamente popular para uma variedade de aplicações. Dependendo do estado morfológico, as características do  $TiO_2$  podem alterar a forma como ele interage com as moléculas biológicas, determinando, assim, sua capacidade citotóxica (ÇEŞMELI; BIRAY AVCI, 2019). No presente estudo, a citotoxicidade de  $Ti(OH)_4$  em diferentes concentrações, ativado ou não pela luz visível, foi determinado pós 24 horas de exposição em células tumorais de bexiga (MB49) e células não tumorais (L929). As **Figuras 17C e 17D** mostram que ambas as linhagens celulares expostas ao  $Ti(OH)_4$  inativado preservaram sua integridade, que foi praticamente equivalente ao grupo não tratado. Isso pode ser atribuído ao fato de que o  $Ti(OH)_4$  ser biocompatível na ausência de luz e apenas  $Ti(OH)_4$  ativado pode produzir grandes quantidades de espécies reativas após ser exposto à luz. Além disso, uma pequena toxicidade foi observada para concentrações acima de 1 mg/mL, mas isso pode ter sido causado simplesmente por um excesso de material nanométrico. No entanto, após a fotoativação por 1 hora (**Figura 17A e 17B**) e 24 horas de cultura, a toxicidade de  $Ti(OH)_4$  aumentou significativamente sobre a linhagem tumoral (**Figura 17C**), independentemente da quantidade de  $Ti(OH)_4$  utilizada. Comparando os períodos de tempo para a cultura exposta a diferentes quantidades de  $Ti(OH)_4$  ativado por 1 hora de luz visível (**Figuras 17E e 17F**), a cultura de 12 horas produziu o maior efeito citotóxico para células tumorais,

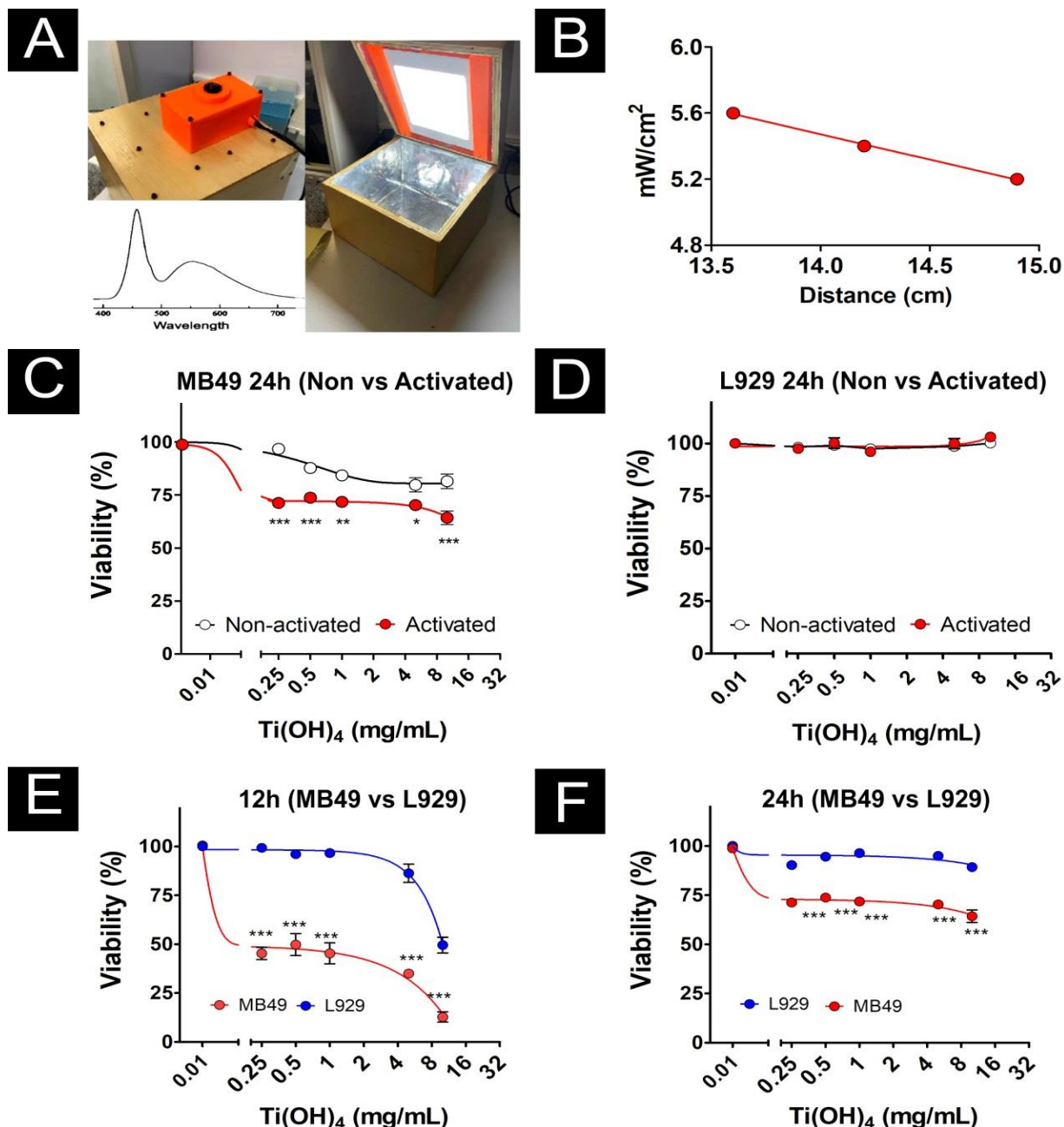
O microambiente tumoral é caracterizado por hipóxia e outros subprodutos do metabolismo das células tumorais, que se adaptam para sobreviver e responder ao aumento de energia demandado por sua alta taxa proliferativa. Áreas neoplásicas altamente povoadas contém vários clones cuja sensibilidade ao estresse oxidativo varia, gerando resistência à hipóxia- o que é incomum em populações de células saudáveis.

Os resultados de viabilidade da linhagem celular MB49 após 24 horas de tratamento

apresentaram valores superiores em comparação com 12 horas. É provável que os clones que sobreviveram à dose inicial de  $\text{Ti}(\text{OH})_4$  foram capazes de proliferar e recompor parcialmente a população tumoral (**Figura 17E**). Além disso, a linhagem não tumoral L929 não foi afetada pela presença de  $\text{Ti}(\text{OH})_4$  até 4 mg/mL após 12 horas (**Figura 17E**) e até 16 mg/mL após 24 horas de exposição (**Figura 17F**), uma distinção que poderia tornar o  $\text{Ti}(\text{OH})_4$  vantajoso para o uso na seletividade de células tumorais de bexiga. Escolhemos a linhagem L929 para este estudo por serem comumente utilizadas como referência para a avaliação da citotoxicidade em células tumorais (IVANKOVIC et al., 2006), além de serem muito sensíveis a intermediários reativos de oxigênio (GOOSSENS et al., 1995) e terem seu comportamento bem estabelecido (HUMPHREYS; WILSON, 1999).

Devido à preferência pela glicólise para a obtenção de energia, as células cancerígenas, mesmo em condições aeróbicas, apresentam maior metabolismo e produção de EROs do que as células normais. Embora os mecanismos antioxidantes das células neoplásicas também sejam maiores, a capacidade de compensação antioxidante acaba ficando completamente comprometida, impossibilitando a adaptação à uma situação de maior demanda. Ao contrário das células normais, isso significa que as células neoplásicas não podem suportar um aumento adicional nos níveis de EROs e, portanto, tratamentos que aumentam os níveis de EROs acabam produzindo um efeito citotóxico seletivo em células tumorais (LIU; WANG, 2015).

Nesse caso, podemos especular que a linhagem L929 tem um limiar de resistência maior à produção externa de EROs do que MB49, uma vez já demonstrado que as células L929 têm maior capacidade de sobreviver sob estresse oxidativo do que as linhagens de câncer MDA-MD-23, MCF-7 e T47 (SALEHI et al., 2018).

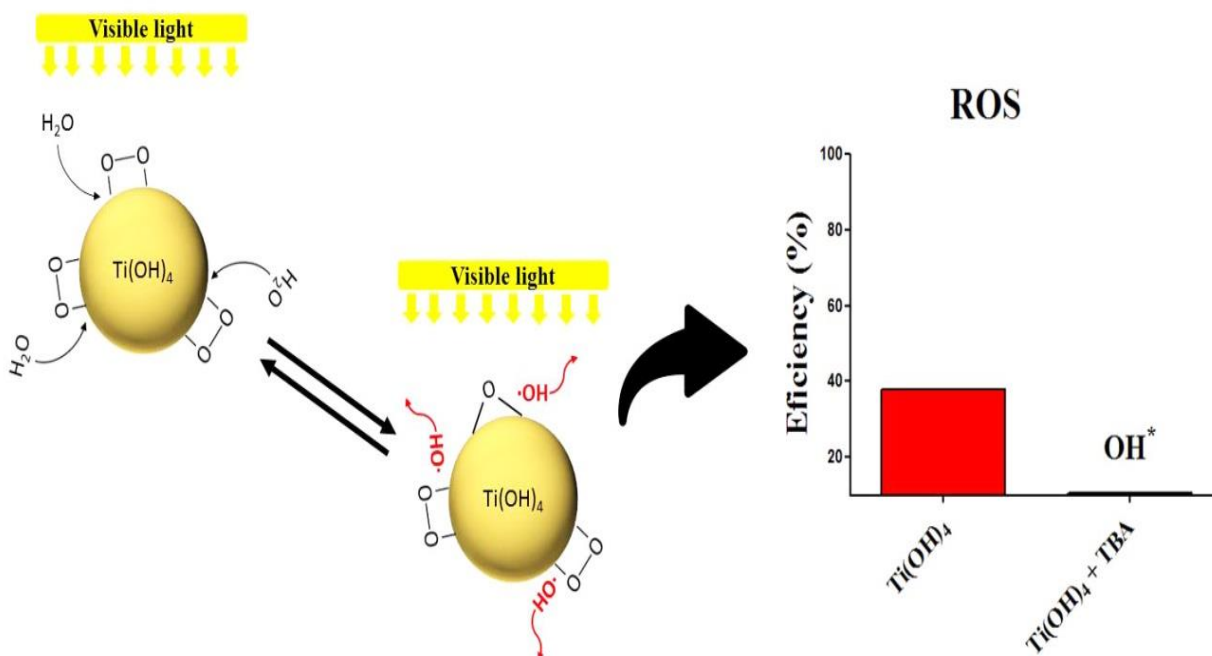


**Figura 17.** Ensaio de citotoxicidade de células não tumorais (L929) e de tumor da bexiga (MB49) expostas a  $Ti(OH)_4$  nas seguintes concentrações: 0.25; 0.5; 1.0; 5.0; e 10.0 mg /ml em diferentes condições (n = 4). (A) Sistema composto por uma caixa (10,5x22x23cm) contendo um led de luz visível para ativar o  $Ti(OH)_4$ ; (B) Sistema de luz visível projetado para liberar cerca de 5,16 mW/cm<sup>2</sup> de energia, distribuída por fótons com comprimento de onda entre 400 e 750 nm contendo dois picos (440 e 550 nm) e um vale em 475 nm; (C) MB49 e (D) L929 exposto a  $Ti(OH)_4$  ativado ou não ativado pela luz visível (1h) e imediatamente incubado por 24h no escuro; (E) Comparação da medição da citotoxicidade das células MB49 e L929 quando expostas ao  $Ti(OH)_4$  ativado por 1 hora sob luz visível e incubado por 12 horas no escuro; (F) Comparação da medição da citotoxicidade das células MB49 e L929 quando expostas ao  $Ti(OH)_4$  ativado por 1 hora sob luz visível e incubado por 24 horas no escuro. Os pontos representam os valores médios  $\pm$  o erro padrão médio (SEM). As diferenças estatísticas foram estabelecidas por ANOVA de dois fatores com análise post-hoc usando o teste de Dunnett. Os valores estatisticamente significativos foram  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,1$  (\*). Fonte: Autoria própria.

#### 4.4.2. Efeito do $\text{Ti(OH)}_4$ ativado nos níveis de EROs intracelulares

O sucesso do uso da PDT como tratamento anticâncer depende da capacidade do PS em produzir EROs e causar estresse oxidativo intracelular (RAILKAR; AGARWAL, 2018). Normalmente, fotocatalisadores de óxido apenas absorvem fótons para produzir pares elétron/buraco que irão produzir EROs a partir do oxigênio molecular disponível ao redor da nanopartícula.

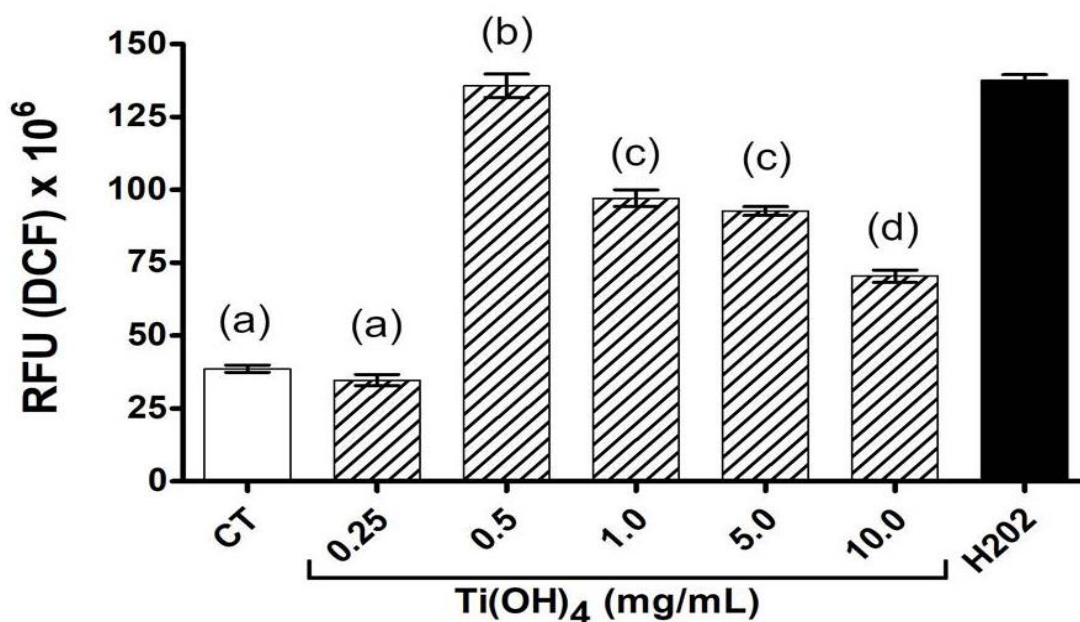
No caso do  $\text{Ti(OH)}_4$  em vez do  $\text{O}_2$  molecular, o aceitador de elétrons é o grupo peróxido ligado à superfície da nanopartícula. Como o elétron fotoexcitado é formado após a absorção da luz visível pelos grupos peróxidos na superfície, o processo parece ser semelhante à geração de radical hidroxila a partir da redução do peróxido de hidrogênio (**Figura 18**) (NOGUEIRA et al., 2018). Uma vez que  $\text{Ti(OH)}_4$  é uma mistura de anatase e rutilo, quantidade de grupos peróxidos é consumida para produzir EROs (FRANCATTO et al., 2016), no entanto, o material tem quase 1 mol de molécula de peróxido por grama de nanopartículas, o que é uma grande quantidade de oxigênio que permite que o sistema esteja ativo durante vários ciclos sem uma diminuição significativa da reatividade (NOGUEIRA et al., 2018; RIBEIRO et al., 2019).



**Figura 18.** Mecanismo proposto para geração de ROS por  $\text{Ti(OH)}_4$ . Degradação fotocatalítica de RhB de  $\text{Ti(OH)}_4$  na presença de TBA sob irradiação de luz visível. A diminuição na barra representa a produção e captura de  $\text{OH}^*$  pela TBA. Fonte: Autoria própria.

Assim, os níveis de EROs em células MB49 foram determinados após exposição ao  $\text{Ti(OH)}_4$  ativado por luz visível (1 hora). Provavelmente devido à meia-vida extremamente curta dos radicais livres, a maioria das EROs responsáveis pela oxidação dos marcadores de H2DCF são de origem intrínseca. No nosso caso, podemos especular que as EROs detectadas esta mais relacionadas às atividades oxidantes do  $\text{Ti(OH)}_4$  internalizado do que à produção de EROs no ambiente extracelular. Trabalhos com nanopartículas mostram que quanto maior a nanopartícula, mais rápida é a detecção de EROs intracelular por oxidação de DCF (ONODERA et al., 2015).

A **Figura 19** mostra que as quantidades de EROs em células MB49 expostas a uma concentração de 0.5 mg/mL de  $\text{Ti(OH)}_4$  foi significativamente maior em comparação com o grupo controle não tratado. Essa aparente diferença nas quantidades relativas de EROs pode ser explicada pela área de superfície específica dos materiais nanométricos (LANONE; BOCZKOWSKI, 2006; SIOUTAS; DELFINO; SINGH, 2005; WILSON et al., 2002). Normalmente, os átomos na superfície da partícula exibem energia mais alta do que aquelas localizadas na superfície dos materiais convencionais devido ao elevado número de ligações químicas insatisfeitas (DAYEM et al., 2017; FAN et al., 2011). No entanto, embora o tamanho típico das partículas de  $\text{Ti(OH)}_4$  seja de 5 nm, elas podem formar grandes aglomerados de até 800 nm dependendo da quantidade de material adicionado ao sistema (FRANCATTO et al., 2016; NOGUEIRA et al., 2018; RIBEIRO et al., 2019). Isso poderia explicar o comportamento da medida de EROs intracelular encontrado no presente estudo, uma vez que as maiores concentrações testadas podem se aglutinar, reduzindo a área de superfície catalítica aparente, consequentemente produzindo menos EROs, como demonstrado em dados da literatura (DAYEM et al., 2017; LANONE; BOCZKOWSKI, 2006).



**Figura 19.** (A) Representação da produção de ROS por  $\text{Ti(OH)}_4$  por ativação de luz visível; (B) Quantificação de ROS intracelulares em células MB49 expostas a  $\text{Ti(OH)}_4$  ativadas por 1 hora com luz visível nas seguintes concentrações: 0.25; 0.5; 1.0; 5.0; 10.0 mg/mL ( $n = 4$ ). A solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi usada como um controle positivo para induzir o estresse oxidativo nas células (10  $\mu\text{mol/L}$  por 30 min de exposição). As células sem qualquer tratamento foram utilizadas como controle negativo (CT). As colunas representam os valores médios  $\pm$  erro padrão médio (SEM). As diferenças estatísticas foram estabelecidas por ANOVA de um fator com análise post-hoc usando o teste de Tukey. Grupos com letras diferentes foram considerados estatisticamente diferentes entre si com  $p < 0,01$ . Autoria própria.

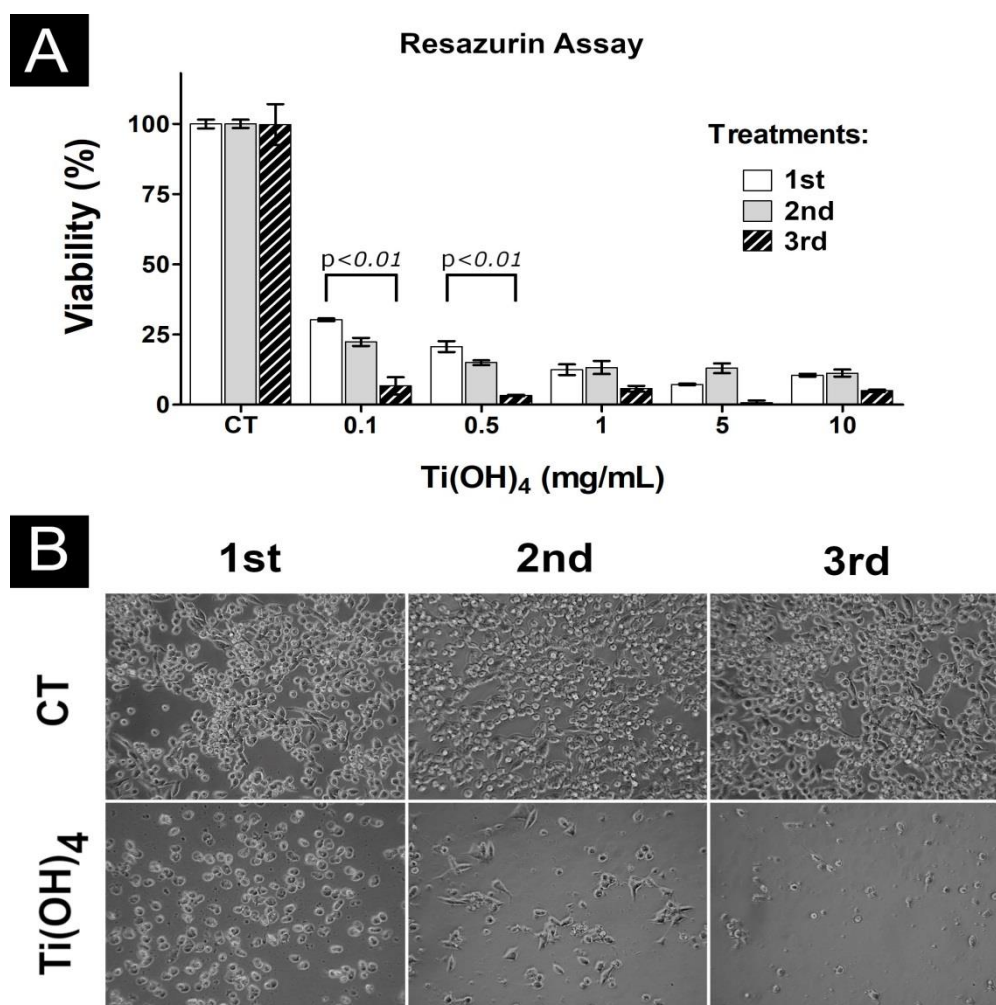
#### 4.4.3. Influência do número de reexposições ao $\text{Ti(OH)}_4$ ativado na citotoxicidade de células MB49

A maioria dos fotossensibilizadores usados no PDT são degradados pela luz (BONNETT; MARTINEZ, 2010; STRATONNIKOV; MEEROVICH; LOSCHENOV, 2000). Esta característica pode ser vantajosa ou desvantajosa em face do tratamento do câncer, uma vez que o tempo de terapia pode não ser suficiente para a destruição do tecido tumoral se o fotossensibilizador sofrer fotodegradação rápida durante o período de iluminação (BONNETT; MARTINEZ, 2010; ROTOMSKIS; STRECKYTE; BAGDONAS, 1997; STRATONNIKOV; MEEROVICH; LOSCHENOV, 2000). Este aspecto pode ser corrigido diminuindo a intensidade da luz, seguido de múltiplas exposições ao PDT (HADJUR et al., 1998).

Uma análise do efeito de tratamentos repetidos foi realizada expondo células MB49 a até três repetições sucessivas de PDT usando diferentes quantidades de  $\text{Ti(OH)}_4$  ativado, com 12 horas de incubação entre os tratamentos. A **Figura 20A** mostra que para a primeira ou



segunda exposição, a toxicidade de  $\text{Ti(OH)}_4$  aumenta de maneira dependente da dose. Após a terceira dose, a toxicidade atingiu o maior valor, independente da faixa de concentração estudada (0.1 a 10 mg/mL). A **Figura 20B** mostra uma diminuição na densidade celular em comparação com o grupo controle, bem como mudanças no fenótipo característico da linha celular a partir da primeira exposição. Este resultado está de acordo com as taxas metabólicas reduzidas mostradas no ensaio.

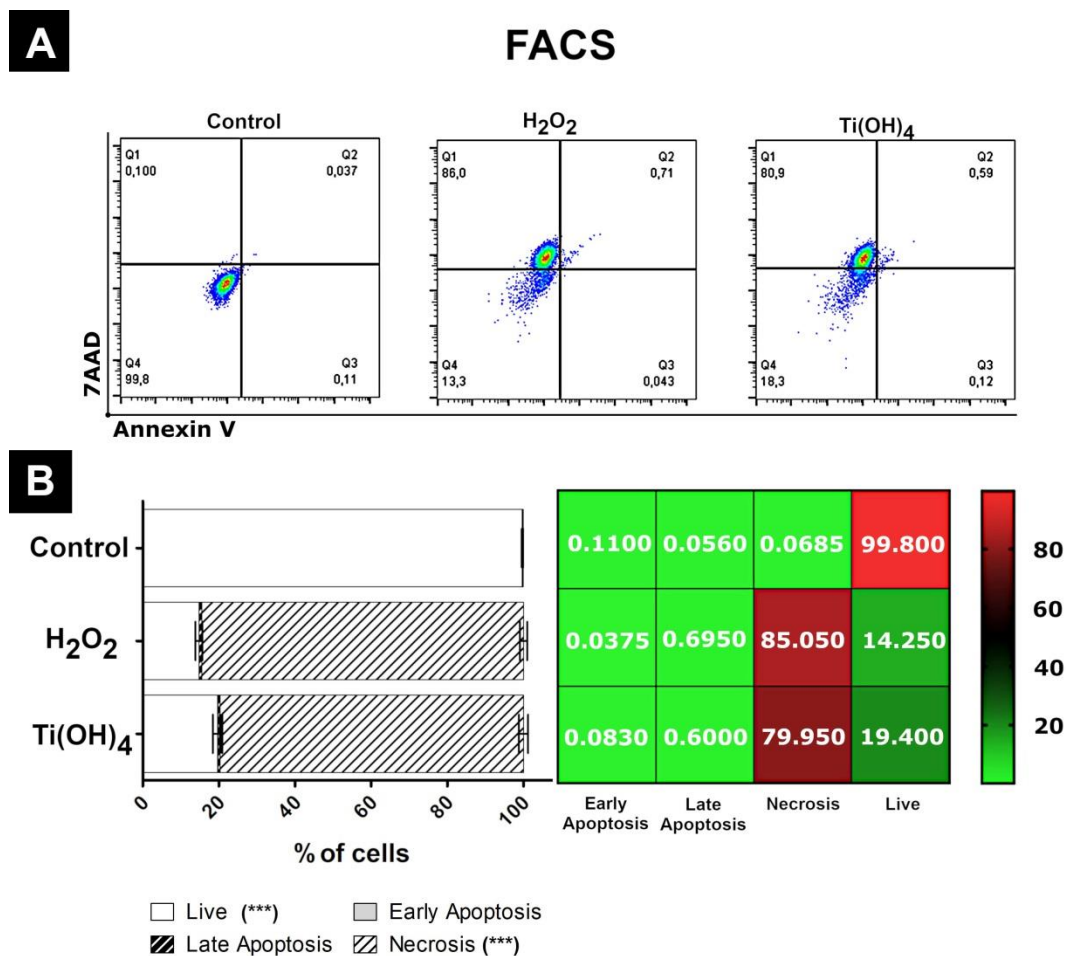


**Figura 20:** (A) Ensaio de citotoxicidade de células MB49 expostas a  $\text{Ti(OH)}_4$  em três regimes de reexposição nas seguintes concentrações: 0.1; 0.5; 1.0; 5.0 e 10.0 mg/mL ( $n = 4$ ); Tratamento I: exposição a uma dose de  $\text{Ti(OH)}_4$  e quantificação da citotoxicidade após 12 horas de incubação no escuro; Tratamento II: exposições a duas doses de  $\text{Ti(OH)}_4$  com intervalos intermediários de cultivo de 12 horas e quantificação da citotoxicidade após 24 horas de incubação no escuro; Tratamento III: exposições a três doses de  $\text{Ti(OH)}_4$  com intervalos intermediários de cultivo de 12 horas e quantificação da citotoxicidade após 36 horas de incubação no escuro. As colunas representam os valores médios dos grupos  $\pm$  o erro padrão da média (SEM). As diferenças estatísticas foram estabelecidas por ANOVA de dois fatores com análise post-hoc usando o teste de Dunnett. Valores estatisticamente significativos (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; (B) Imagem representativa das mudanças morfológicas das células MB49 expostas a um regime de 3 doses subsequentes de  $\text{Ti(OH)}_4$  a uma concentração de 0.5 mg/mL. Imagens capturadas com ampliação de 20X. Fonte: Autoria própria.

#### 4.4.4. Determinando o tipo de morte celular

O tipo de morte celular induzida pela PDT depende do tipo celular, das características do agente PS (mecânica, óptica, elétrica, dimensional, morfológica, grau de degradabilidade e reatividade superficial), da localização intracelular, sua concentração, intensidade luminosa e excitação comprimento de onda e quantidade de oxigênio molecular disponível nos tecidos (BUYTAERT; DEWAELE; AGOSTINIS, 2007; TOMLINSON et al., 2015). A apoptose pode ser induzida em doses terapêuticas mais baixas (MROZ et al., 2011) por ativação enzimática do Bcl-2 (Bax/Bcl-2) ou da família das caspase-3 (PERILLO et al., 2020). Por outro lado, doses mais elevadas de PDT tendem a causar morte celular por necrose porque PDT tem uma alta capacidade de produzir EROs (ALMEIDA et al., 2004) e pode afetar principalmente as vias de sinalização de proteases e calpaínas (BUYTAERT; DEWAELE; AGOSTINIS, 2007).

Os resultados de nossos experimentos submetidos à citometria de fluxo mostraram que a aplicação de 3 doses de  $Ti(OH)_4$  (0,5 mg/mL) induziu predominantemente a morte celular por necrose (80%) em células tumorais de bexiga MB49 (**Figura 21**), além disso a uma quantidade mínima de morte celular por apoptose (0,68%). Isso pode estar diretamente relacionado à capacidade do  $Ti(OH)_4$  de produzir grandes quantidades de EROs (**Figura 18**) sem a necessidade de oxigênio molecular, como no caso do carcinoma urotelial de bexiga. Assim, a terapia de repetição foi capaz de causar necrose das células tumorais, o que pode ser corroborado por estudos anteriores (ALMEIDA et al., 2004; MROZ et al., 2011; PERILLO et al., 2020).



**Figura 21:** Identificação do tipo de morte celular causada em células MB49 expostas a 3 doses de Ti(OH)<sub>4</sub> na concentração de 0.5 mg/mL em intervalos de 12 horas. Grupo de controle não tratado exposto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 μM por 2 horas). Quantificação por citometria de fluxo. (A) Gráficos de conjugados fluorescentes de 7AAD vs. anexina V usados para classificar subpopulações em: (Q1) população de células em morte celular por necrose; (Q2) população de células em estágio final de morte celular por apoptose; (Q3) população de células nos estágios iniciais de morte celular por apoptose; (Q4) população de células predominantemente viável. (B) Gráfico de barras horizontais mostrando as quantidades significativas de células vivas, apoptóticas e necróticas presentes em cada grupo analisado ± SEM. As diferenças estatísticas foram estabelecidas por ANOVA de dois fatores com análise post-hoc usando o teste de Bonferroni. Valores estatisticamente significativos (\*\*\*) p < 0,001. Ao lado, um gráfico numérico mostra a predominância de cada subpopulação de células para cada grupo analisado. Fonte: Autoria própria.

Doses subsequentes podem causar danos cumulativos progressivos às estruturas celulares e afetar clones que podem resistir melhor ao estresse oxidativo (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Outros estudos descobriram que o dano irreversível causado pela PDT em células tumorais foi associado à morte celular necrótica associada à autofagia independente da caspase (BUYTAERT et al., 2006; MROZ et al., 2011), resultante da disfunção mitocondrial e lisossomal (MARTINS et al., 2015, 2019). A autofagia é um processo comumente conhecido como resistência celular e sobrevivência ao estresse (LIN et al., 2014). Envolve a captação de

proteínas citoplasmáticas disfuncionais e organelas por vesículas de membrana dupla que se fundem com lisossomas para formar autolisossomos, onde ocorre degradação das estruturas celulares (BAEHRECKE, 2005; GOZUACIK; KIMCHI, 2004; LEVINE; YUAN, 2005). Estudos têm mostrado que uma alta concentração de EROs intracelular pode estimular a ativação direta da autofagia (AMARAVADI; THOMPSON, 2007; STERN; ADISESHAIAH; CRIST, 2012). Algumas terapias têm usado a estratégia de indução autofágica em células tumorais (KESSEL, 2006) para apoiar a resposta de agentes quimioterápicos (NOTTE; LECLERE; MICHIELS, 2011). Nesse caso, o aumento do estresse oxidativo aumenta os danos intracelulares e podem causar o acúmulo de vacúolos que servem para remover as organelas danificadas, iniciando a morte celular (CUERVO, 2004; KONDO et al., 2005).

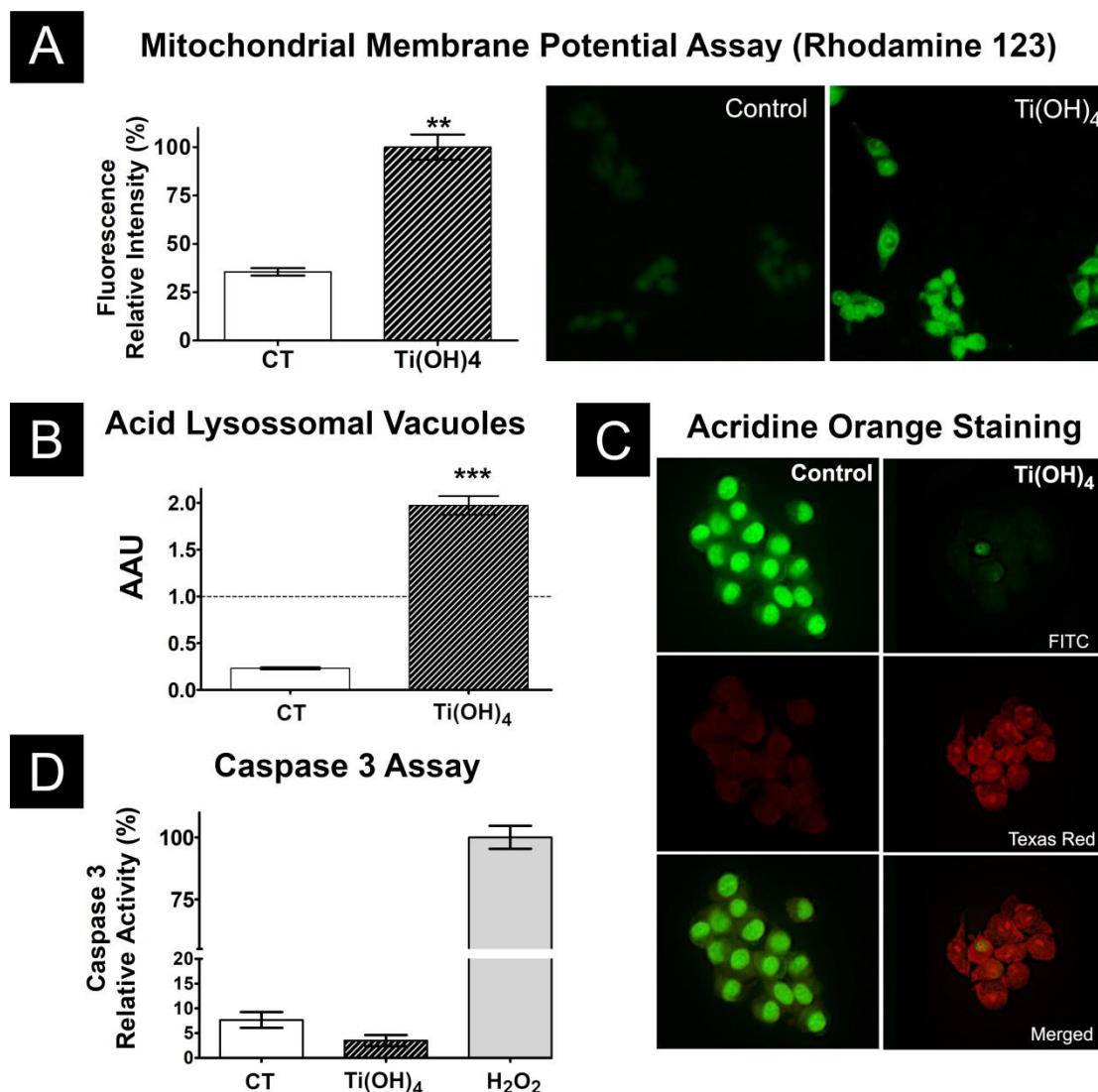
Portanto, comparamos uma possível disfunção lisossomal com o potencial de membrana mitocondrial e a atividade da caspase-3 para identificar o principal fator desencadeador de morte celular após a PDT usando  $Ti(OH)_4$ .

Uma vez que as funções mitocondriais são afetadas principalmente pelo aumento do estresse oxidativo, o potencial elétrico das membranas mitocondriais foi analisado pela incorporação de rodamina 123. Este é um fluorocromo catiônico que é atraído por mudanças no nível de integridade mitocondrial e pode ser detectado pelo aumento da fluorescência verde citosólica. Na **Figura 22A**, pode-se observar que o tratamento PDT com  $Ti(OH)_4$  em células MB49 causou uma diferença significativa no potencial elétrico, o que pode ser explicado pela grande quantidade de EROs produzida quando  $Ti(OH)_4$  foi exposto à luz visível .

Assim, ao analisar a incorporação do corante vermelho neutro nas células MB49, na **Figura 22B**, foi possível verificar que a correlação entre o acúmulo de vacúolos lisossomais ácidos e a viabilidade celular nessas condições, apresentou valores acima de 1, o que é indicativo do tipo morte celular II. Da mesma forma, na análise da incorporação do fluoróforo laranja de acridina, na **Figura 22C**, é possível notar a maior acidificação do conteúdo citoplasmático em relação ao grupo controle (CHEN et al., 2008). Portanto, PDT usando  $Ti(OH)_4$  causa o acúmulo de lisossomos tardios nas células do câncer de bexiga. Por sua vez, a **Figura 22D** mostra que não houve aumento na atividade enzimática da caspase-3 no grupo tratado, o que pode ser interpretado como inibição da via de morte celular por apoptose. Esta observação está de acordo com a literatura (XU et al., 2006).

Esses resultados sugerem que a diferença no potencial de membrana mitocondrial causada pelo estresse oxidativo em células MB49 expostas ao  $Ti(OH)_4$  pode desencadear o

acúmulo de vesículas de ácido lisossomal no interior das células tumorais. No entanto, grandes quantidades de vesículas ácidas são conhecidas por levar à morte celular do tipo II (NIKOLETOPOULOU et al., 2013). Assim, nossos dados sugerem que a morte celular necrótica causada pela terapia com  $Ti(OH)_4$  pode ser iniciada por disfunções no processo autofágico. No entanto, mais dados são necessários para apoiar nossa hipótese.



**Figura 22.** Quantificação de vacúolos lisossomais ácidos, ativação da caspase-3 e potencial elétrico mitocondrial de células MB49 expostas a  $Ti(OH)_4$  a uma concentração de  $6 \mu\text{g/mL}$  ativadas por 1h de luz visível por 1 hora e 12 horas de incubação em o escuro. (A) Ensaio qualitativo potencial de membrana mitocondrial: imagens de células que mostram a diferença na intensidade de fluorescência produzida pela exposição de células à Rodamina 123 no grupo controle (menor intensidade de fluorescência) em comparação com o grupo tratado (maior intensidade de fluorescência). O gráfico de barras oposto compara quantitativamente a intensidade de fluorescência relativa média  $\pm$  SEM do grupo tratado em comparação com o grupo de controle. As imagens foram adquiridas com ampliação de 40X; (B) Ensaio de vermelho neutro de quantificação de vacúolo lisossomal ácido: gráfico de barras dos índices de unidade de excesso de vacúolo ácido intracelular (AAU) calculados por  $\pm$  SEM média com dados coletados de ensaios de viabilidade em relação à absorção de vermelho neutro (AAU)  $> 1$  representa a célula do tipo II morte); (C) Ensaio qualitativo vacúolos de ácido lisossomal: imagens de células MB49 expostas ao fluoróforo laranja de acridina, mostrando as diferenças morfológicas entre o grupo controle que exibe intensa atividade fluorescente no núcleo (filtro FITC - 525 nm), em comparação com os grupos tratados com  $Ti(OH)_4$ , que exibe pouca atividade fluorescente no núcleo, que contém granulações com maior intensidade fluorescente no citoplasma (Texas Red

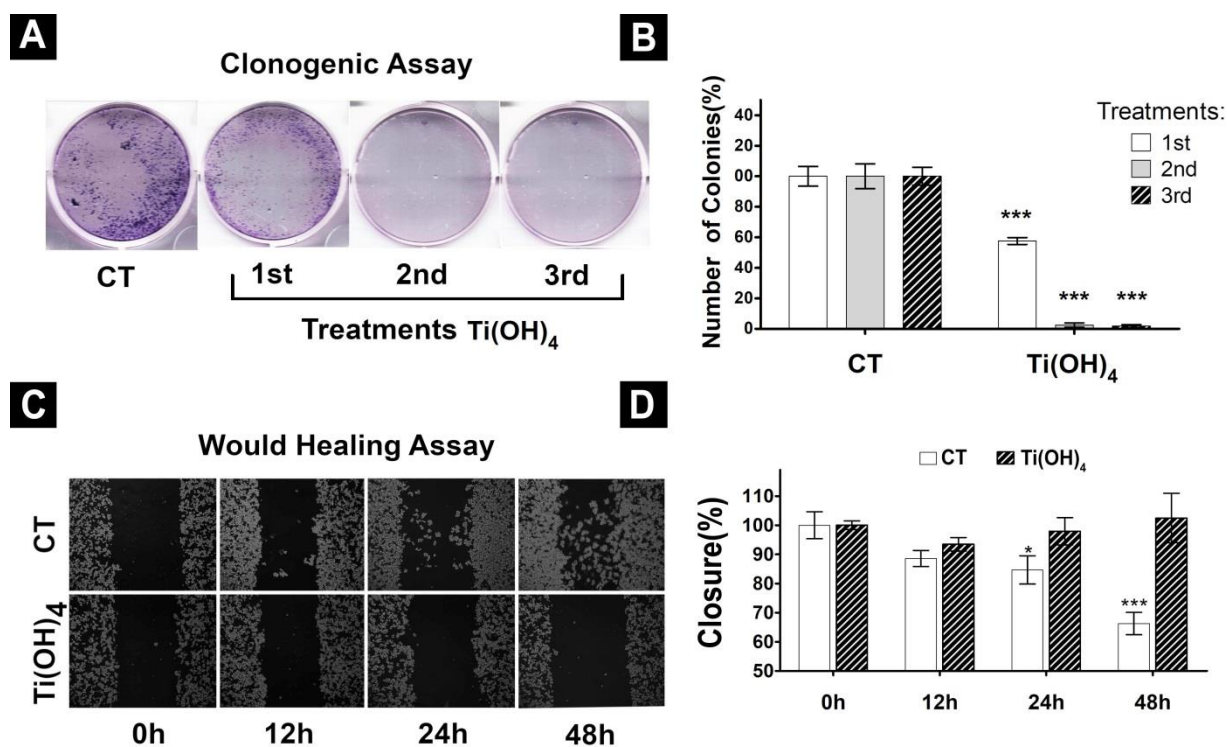
Filter - 650 nm); (D) Gráfico de barras comparando a atividade média da enzima caspase-3  $\pm$  SEM do grupo tratado em relação ao grupo controle que quantificou a atividade enzimática aplicando o kit EnzChek® Caspase-3. Fonte: Autoria própria.

#### 4.4.5. Efeito do $Ti(OH)_4$ na capacidade clonogênica e migratória de células MB49

Além da capacidade citotóxica do PS como um material importante e determinante em tratamentos fotodinâmicos, estratégias contra proliferação e processos metastáticos também têm sido alvo de estudos terapêuticos. Para que a metástase seja bem-sucedida, uma série de barreiras deve ser superada: as células tumorais devem se desprender do sítio primário, atingir a corrente sanguínea ou linfática, resistir à pressão dos vasos sanguíneos, extravasar, se adaptar ao novo microambiente e resistir aos ataques do sistema imunológico (MASSAGUÉ; OBENAUF, 2016; WELCH; HURST, 2019). Conforme apontado por (WENG et al., 2021), PDT pode reduzir o número de células tumorais e impedi-las de migrar para os tecidos adjacentes, uma vez que o estresse oxidativo produzido durante o tratamento é capaz de bloquear os vasos sanguíneos (KHURANA et al., 2009; WANG; MORIYAMA; BAGNATO, 2013; WENG et al., 2021) e diminuir a recorrência do tumor. Da mesma forma, outros estudos mostraram que a autofagia também pode desempenhar um papel importante no processo metastático (SHARIFI et al., 2016; TOWERS; WODETZKI; THORBURN, 2020). A formação de autolisossomos pode produzir complexos de adesão focal que diminuem a motilidade celular (KENIFIC et al., 2016; SHARIFI et al., 2016).

Conforme visto na **Figura 23**, uma concentração abaixo da concentração citotóxica (6  $\mu\text{g/mL}$ ), portanto incapaz de causar a morte das células MB49, foi usada para garantir que apenas os mecanismos de ação terapêuticos pudessem ser observados. As **Figuras 23A e 23B** mostram que apenas uma dose de  $Ti(OH)_4$  não foi suficiente para inibir a capacidade proliferativa das células MB49, visto que as células tumorais apresentaram aumento significativo no número de colônias após o período pós-incubação. No entanto, a terapia foi capaz de inibir completamente a proliferação e prevenir a formação de colônias após a exposição a três doses. O ensaio clonogênico, com sua capacidade de quantificar o crescimento celular e os efeitos citotóxicos ou genotóxicos, tem sido utilizado como ferramenta padrão para avaliação de compostos com ação antineoplásica. Nossos resultados podem indicar que mesmo uma célula localizada nas profundezas do tumor e submetida a uma dose subletal do composto, poderia ser impedida de colonizar novos sítios.

Portanto, o ensaio de migração celular avaliou a capacidade migratória das células em direção ao gradiente quimiostático. Conforme mostrado nas **Figuras 23C e 23D**, não havia células na região arranhada após 48 horas de reexposição a três doses de  $Ti(OH)_4$  ativado, enquanto células agrupadas foram observadas no grupo de controle após 24 horas de cultura. Na verdade, esse resultado pode estar diretamente relacionado à inibição da capacidade migratória do MB49 após a PDT, uma vez que a proliferação variável foi descartada quando o FBS foi removido do meio celular. Além disso, as células não apresentaram capacidade proliferativa após a reexposição de 3 doses de  $Ti(OH)_4$ , como também pode ser observado no ensaio de proliferação celular (**Figuras 23A e 23B**)



**Figura 23.** Efeito na formação de colônias e migração de células MB49 após exposição a 3 doses subsequentes de  $Ti(OH)_4$  a uma concentração de 6  $\mu g/mL$  ativada por 1h de luz e 12h de incubação no escuro (n=4). (A) Ensaio qualitativo de formação de colônias: imagem correspondente à réplica representativa de três experimentos independentes cultivados por 5 dias após as respectivas exposições, mostrando a inibição da proliferação celular exposta a uma concentração abaixo do subletal; (B) Formação de colônias no ensaio quantitativo: número de colônias normalizadas em relação ao grupo controle, mostrando estatisticamente as diferenças encontradas no ensaio qualitativo. As colunas representam os valores médios dos grupos e o erro padrão da média (SEM). As diferenças estatísticas foram estabelecidas pelo teste ANOVA de duas vias com análise post-hoc usando o teste de Dunnett. Valores estatisticamente significativos (\*\*\*)  $p < 0,001$ . (C) Ensaio qualitativo de migração celular: imagem correspondente à réplica representativa de três experimentos independentes após 3 doses subsequentes e analisada após 0h, 12h, 24h e 48h de exposição, mostrando a inibição da migração celular para o espaço determinado quando exposta a uma concentração abaixo subletal. Imagens com ampliação de 20X. (D) Migração de células de ensaio quantitativo: gráfico de barras comparando a média  $\pm$  SE SEM medições da área livre de

células relativa ao longo dos quatro intervalos de tempo. As colunas representam os valores médios dos grupos e do SEM. As diferenças estatísticas foram estabelecidas por ANOVA de dois fatores com análise post-hoc usando o teste de Dunnett. Valores estatisticamente significativos (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; (\*)  $p < 0,1$ . Fonte: Autoria própria.

Os cânceres de bexiga não invasivos representam 60 a 80% dos casos (KNOWLES; HURST, 2015). Embora tenha uma baixa taxa de invasão e uma alta chance de sobrevivência do paciente, aproximadamente 30% dessas neoplasias tendem a progredir para músculo invasivo e representam um risco de sobrevivência do paciente (FONG et al., 2020). Assim, o tratamento da PDT com  $Ti(OH)_4$  in situ (Cis), estágios não invasivos papilar (Ta) e lâmina própria (T1) pode representar uma grande perspectiva no desenvolvimento da terapia e erradicação da doença (FONG et al., 2020). Seguindo esse raciocínio, as camadas superficiais da bexiga são os compartimentos com maior propensão a receber instilação de partículas e exposição à luz visível com menos invasividade, o que conseqüentemente leva a um tratamento mais eficaz.

A terapia baseada em PDT usando  $Ti(OH)_4$  pode empregar instalação intravesical para concentrar o composto na área tumoral. Especulamos que o aumento da permeabilidade causado pela perda de células guarda-chuva durante o desenvolvimento tumoral poderia facilitar a concentração de partículas de  $Ti(OH)_4$  no tecido afetado, potencializando sua ação sobre a área tumoral e diminuindo a ocorrência de efeitos fora do alvo. Enquanto o urotélio é considerado impenetrável para a maioria das substâncias contidas na urina (WANG et al., 2021), as células cancerosas uroteliais podem internalizar mais partículas do que as células guarda-chuva normais (IMANI et al., 2015).

#### **4.5.CONCLUSÃO**

Em conclusão,  $Ti(OH)_4$  pode inibir a proliferação e mobilidade de células MB49 em baixas concentrações e induzir a morte por necrose em altas concentrações. Especulamos que a morte causada durante a terapia é possivelmente ativada por mecanismos de disfunção mitocondrial e lisossomal causados por alterações no ambiente oxidativo promovidas pela alta produção de EROs.



## 1 Modified Titanium Dioxide as a Potential Visible-Light-Activated 2 Photosensitizer for Bladder Cancer Treatment

3 Thaiane Robeldo,\* Lucas S. Ribeiro, Lida Manrique, Andressa Mayumi Kubo, Elson Longo,  
4 Emerson Rodrigues Camargo, and Ricardo Cameiro Borra

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c07046>

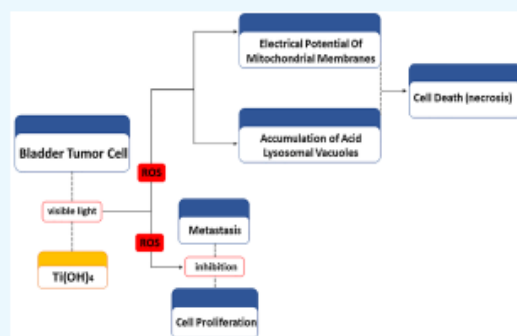
Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

5 **ABSTRACT:** Low oxygen concentration inside the tumor micro-  
6 environment represents a major barrier for photodynamic therapy of  
7 many malignant tumors, especially urothelial bladder cancer. In this  
8 context, titanium dioxide, which has a low cost and can generate high  
9 ROS levels regardless of local O<sub>2</sub> concentrations, could be a potential  
10 type of photosensitizer for treating this type of cancer. However, the  
11 use of UV can be a major disadvantage, since it promotes breakage of  
12 the chemical bonds of the DNA molecule on normal tissues. In the  
13 present study, we focused on the cytotoxic activities of a new material  
14 (Ti(OH)<sub>4</sub>) capable of absorbing visible light and producing high  
15 amounts of ROS. We used the malignant bladder cell line MB49 to  
16 evaluate the effects of multiple concentrations of Ti(OH)<sub>4</sub> on the  
17 cytotoxicity, proliferation, migration, and production of ROS. In



## 5. CONCLUSÃO GERAL

Demonstramos que  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> irradiados de diferentes formas, Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:Au e Ti(OH)<sub>4</sub> apresentaram características promissoras quanto a toxicidade e seletividade contra células malignas. Nossos resultados são promissores para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer de bexiga.

## ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

SANTOS, M. P.; **ROBELDO, THAIANE**; CASTANEDA, E. D; PINTO, K. N. Z.; BORRA, R. C.. Tissue microarray: physical and chemical parameters involved in the construction of recipient blocks. JORNAL BRASILEIRO DE PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL (IMPRESSO), v. 53, p. 261-269, 2017.

ASSIS, M.; **ROBELDO, T.**; FOGGI, C. C.; KUBO, A. M.; MÍNGUEZ-VEGA, G.; CONDONCILLO, E.; BELTRAN-MIR, H.; TORRES-MENDIETA, R.; ANDRÉS, J.; OLIVA, M.; VERGANI, C. E.; BARBUGLI, P. A.; CAMARGO, E. R. ; BORRA, R. C. ; LONGO, E. . Ag Nanoparticles/ $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> Composite Formed by Electron Beam and Femtosecond Irradiation as Potent Antifungal and Antitumor Agents. Scientific Reports, v. 9, p. 1-15, 2019.

ASSIS, MARCELO; GROppo FILHO, FRANCISCO C.; PIMENTEL, DAYENE S.; **ROBELDO, THAIANE**; GOUVEIA, AMANDA F.; CASTRO, TASSIA F. D.; FUKUSHIMA, HIRLA C. S.; FOGGI, CAMILA C.; COSTA, JOÃO P. C.; BORRA, RICARDO C.; ANDRÉS, JUAN; LONGO, ELSON. Ag Nanoparticles/AgX (X=Cl, Br and I) Composites with Enhanced Photocatalytic Activity and Low Toxicological Effects. ChemistrySelect , v. 5, p. 4655-4673, 2020.

ASSIS, MARCELO; DE FOGGI, CAMILA CRISTINA; TEODORO, VINICIUS; DE CAMPOS DA COSTA, JOÃO PAULO; SILVA, CARLOS EDUARDO; **ROBELDO, THAIANE**; CAPERUCCI, PRISCILA FERNANDA; VERGANI, CARLOS EDUARDO; BORRA, RICARDO CARNEIRO; SORRIBES, IVAN; GOUVEIA, AMANDA FERNANDES; SAN-MIGUEL, MIGUEL ANGEL; ANDRÉS, JUAN; LONGO, ELSON. Surface-dependent photocatalytic and biological activities of Ag<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>: Integration of experiment and simulation. APPLIED SURFACE SCIENCE, v. 545, p. 148964, 2021.

PAGLIARONE, ANA CAROLINA; CASTAÑEDA, EDWIN DAVID; PEDOTT SANTANA, JHONNE PEDRO; DE OLIVEIRA, CAIO ALMEIDA BATISTA; **ROBELDO, THAIANE ALCARDE**; TEIXEIRA, FELIPE ROBERTI; BORRA, RICARDO CARNEIRO. Mitochondrial heat shock protein mortalin as potential target for therapies based on oxidative stress. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 34, p. 102256, 2021.

**THAIANE ROBELDO**, LUCAS S. RIBEIRO, LIDA MANRIQUE, ANDRESSA MAYUMI KUBO, ELSON LONGO, EMERSON RODRIGUES CAMARGO, AND RICARDO CARNEIRO BORRA. Modified Titanium dioxide as a Potential visible-light-activated photosensitizer for Bladder Cancer Treatment. ACS OMEGA. 2022.

## REFERÊNCIAS

ABRAHAMSE, H. et al. Nanoparticles for Advanced Photodynamic Therapy of Cancer. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 35, n. 11, p. 581–588, 2017.

ACHARYA, P. et al. Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 287, n. 2 56-2, 2004.

AKHTAR, M. J. et al. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 845, 2012

ALKILANY, A. M.; MURPHY, C. J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: What we have learned so far? **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 7, p. 2313–2333, 2010.

ALRIC, C. et al. The biodistribution of gold nanoparticles designed for renal clearance. **Nanoscale**, v. 5, n. 13, p. 5930–5939, 2013.

AL TAMEEMI, W. et al. Hypoxia-Modified Cancer Cell Metabolism. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, n. January, p. 1–15, 2019.

ALFANO, M. et al. The interplay of extracellular matrix and microbiome in urothelial bladder cancer. **Nature Reviews Urology**, v. 13, n. 2, p. 77–90, 2016.

ALFRED WITJES, J. et al. Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. **European Urology**, v. 71, n. 3, p. 462–475, 2017.

ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: Tumour-associated macrophages: Undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 167, n. 2, p. 195–205, 2012.

ALLINEN, M. et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. **Cancer Cell**, v. 6, n. 1, p. 17–32, 2004.

ALMEIDA, R. D. et al. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1704, n. 2, p. 59–86, 2004.

ALVAREZ-BERRIOS, M. P. et al. Hybrid Nanomaterials Based on Iron Oxide Nanoparticles and Mesoporous Silica Nanoparticles: Overcoming Challenges in Current Cancer Treatments. **Journal of Chemistry**, v. 2016, 2016.

AMARAVADI, R. K.; THOMPSON, C. B. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 24, p. 7271–7279, 2007.

ANDRÉS, J. et al. Structural and electronic analysis of the atomic scale nucleation of Ag on  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> induced by electron irradiation. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–7, 2014.

ANDRÉS, J. et al. Formation of Ag nanoparticles under electron beam irradiation: Atomistic origins from first-principles calculations. **International Journal of Quantum Chemistry**, v.

118, n. 9, p. 1–15, 2018.

ANTONI, S. et al. Bladder Cancer Incidence and Mortality : A Global Overview and Recent Trends. **European Urology**, v. 71, n. 1, p. 96–108, 2017.

ASHARANI, P. V; HANDE, M. P.; VALIYAVEETTIL, S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. **BMC Cell Biology**, v. 14, p. 1–14, 2009.

ASHIKBAYEVA, Z. et al. Application of nanoparticles and nanomaterials in thermal ablation therapy of cancer. **Nanomaterials**, v. 9, n. 9, 2019.

ASSIS, M. et al. Towards the scale-up of the formation of nanoparticles on  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> with bactericidal properties by femtosecond laser irradiation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1884, 2018.

ASSIS, M. et al. Sio<sub>2</sub>-ag composite as a highly virucidal material: A roadmap that rapidly eliminates sars-cov-2. **Nanomaterials**, v. 11, n. 3, p. 1–19, 2021.

AVALOS, A. et al. Cytotoxicity and ROS production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 4, p. 413–423, 2014.

BABJUK, M. et al. EAU Guidelines on Non–Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. **European Urology**, v. 71, n. 3, p. 447–461, 2017.

BABJUK, M. Trends in Bladder Cancer Incidence and Mortality: Success or Disappointment? **European Urology**, v. 71, n. 1, p. 109–110, 2017.

BABJUK, M. et al. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) - 2019 Update. **European Urology**, v. 76, n. 5, p. 639–657, 2019.

BAEHRECKE, E. H. Autophagy: Dual roles in life and death? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 6, p. 505–510, 2005.

BAHARARA, J. et al. Silver Nanoparticles Biosynthesized Using *Achillea biebersteinii* Flower Extract: Apoptosis Induction in MCF-7 Cells via Caspase Activation and Regulation of Bax and Bcl-2 Gene Expression. **Molecules**, p. 2693–2706, 2015.

BALASUBRAMANIAN, S. K. et al. Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. **Biomaterials**, v. 31, n. 8, p. 2034–2042, 2010.

BARANI, M. et al. Nanotechnology in bladder cancer: Diagnosis and treatment. **Cancers**, v. 13, n. 9, p. 1–29, 2021.

BAYDA, S. et al. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 1–15, 2020.

- BEGNINI, K. R. et al. Auxotrophic recombinant *Mycobacterium bovis* BCG overexpressing Ag85B enhances cytotoxicity on superficial bladder cancer cells in vitro. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 4, p. 1543–1552, 2013.
- BENDALE, Y.; BENDALE, V.; PAUL, S. Evaluation of cytotoxic activity of platinum nanoparticles against normal and cancer cells and its anticancer potential through induction of apoptosis. **Integrative Medicine Research**, v. 6, n. 2, p. 141–148, 2017.
- BERKA, R. M.; GRAY, G. L.; VASIL, M. L. Studies of phospholipase C (heat-labile hemolysin) in *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 34, n. 3, p. 1071–1074, 1981.
- BIAZAR, E. et al. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. **International Journal of Nanomedicine**, p. 1117, 2011.
- BILENSOY, E. et al. Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of Mitomycin C to bladder tumors. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, n. 1–2, p. 170–176, 2009.
- BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. **Nature Immunology**, v. 11, n. 10, p. 889–896, 2010.
- BÖHLE, A. et al. Single Postoperative Instillation of Gemcitabine in Patients with Non-muscle-invasive Transitional Cell Carcinoma of the Bladder: A Randomised, Double-blind, Placebo-controlled Phase III Multicentre Study. **European Urology**, v. 56, n. 3, p. 495–503, 2009.
- BÖHLE, A.; JOCHAM, D.; BOCK, P. R. Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: A formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. **Journal of Urology**, v. 169, n. 1, p. 90–95, 2003.
- BONNETT, R.; MARTINEZ, G. Photobleaching of Sensitisers Used in Photodynamic Therapy. **ChemInform**, v. 33, n. 11, p. no-no, 2010.
- BORRA, R. C. et al. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. **Brazilian Oral Research**, v. 23, n. 3, p. 255–262, 2009.
- BOTTARO, LARSEN, B. Hybrid Nanoparticles for Detection and Treatment of Cancer. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.
- BOTELHO, G. et al. Experimental and Theoretical Study on the Structure, Optical Properties, and Growth of Metallic Silver Nanostructures in Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 11, p. 6293–6306, mar. 2015.
- BOTELHO, G. et al. Photoluminescence and Photocatalytic Properties of Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> Microcrystals: An Experimental and Theoretical Investigation. **ChemPlusChem**, v. 81, n. 2, p. 202–212, 2016.
- 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, n. 6, p. 394–424, 2018.

BROWN, J. M. Exploiting the hypoxic cancer cell : mechanisms and therapeutic strategies. v. 6, n. April, p. 4–9, 2000.

BURGER, M. et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. **European Urology**, v. 63, n. 2, p. 234–241, 2013.

BUSS, J. H. et al. Nano-BCG: A promising delivery system for treatment of human bladder cancer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. JAN, 2018.

BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1776, n. 1, p. 86–107, 2007.

BYRNE, J. D.; BETANCOURT, T.; BRANNON-PEPPAS, L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1615–1626, 2008.

CAIRNS, R.; PAPANDREOU, I.; DENKO, N. Overcoming physiologic barriers to cancer treatment by molecularly targeting the tumor microenvironment. **Molecular Cancer Research**, v. 4, n. 2, p. 61–70, 2006.

CALAHORRA, J. et al. Hypoxia modulates the antioxidant effect of hydroxytyrosol in MCF-7 breast cancer cells. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, p. 1–16, 2018.

CALIXTO, G. M. F. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: A review. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 1–18, 2016.

CASTNER, D. G.; RATNER, B. D. **Biomedical surface science : Foundations to frontiers**. [s.l: s.n.]. v. 500

CAVALCANTE, L. S. et al. Cluster coordination and photoluminescence properties of  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> microcrystals. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 20, p. 10675–10687, 2012.

ČESEN, M. H. et al. Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications. **Experimental cell research**, v. 318, n. 11, p. 1245–1251, 2012.

ÇEŞMELI, S.; BIRAY AVCI, C. Application of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles in cancer therapies. **Journal of Drug Targeting**, v. 27, n. 7, p. 762–766, 2019.

CHELLAT, F. et al. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. **Biomaterials**, v. 26, n. 35, p. 7260–7275, 2005.

CHEN, Y. et al. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, n. 1, p. 171–182, 2008.

CHEN, Q. et al. Intelligent Albumin – MnO<sub>2</sub> Nanoparticles as pH- / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Responsive Dissociable Nanocarriers to Modulate Tumor Hypoxia for Effective Combination Therapy. p. 1–8, 2016.

- CHEN, G. et al. In vitro and in vivo studies of pirarubicin-loaded SWNT for the treatment of bladder cancer. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 8, p. 771–776, 2012.
- CHEN, H.; XU, Y. Photoactivity and stability of Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> for organic degradation in aqueous suspensions. **Applied Surface Science**, v. 319, n. 1, p. 319–323, 2014.
- CHEN, Y. et al. Nonreceptor Tyrosine Kinase c-Yes Interacts with Occludin during Tight Junction Formation in Canine. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. April, p. 1227–1237, 2002.
- CHEUNG, G. et al. Recent advances in the diagnosis and treatment of bladder cancer. **BMC Medicine**, v. 11, n. 1, p. 13, 2013.
- CHOW, E. K. H.; HO, D. Cancer nanomedicine: From drug delivery to imaging. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 216, p. 1–12, 2013.
- CINIGLIA, C. et al. Acridine orange/Ethidium bromide double staining test: A simple In-vitro assay to detect apoptosis induced by phenolic compounds in plant cells. **Allelopathy Journal**, v. 26, n. 2, p. 301–308, 2010.
- CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: What role do they play in physical activity and health? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 2 SUPPL., 2000.
- CLAVERO, C. Plasmon-induced hot-electron generation at nanoparticle/metal-oxide interfaces for photovoltaic and photocatalytic devices. **Nature Photonics**, v. 8, n. 2, p. 95–103, 2014.
- CODONY, V. L.; TAVASSOLI, M. Hypoxia-induced therapy resistance: Available hypoxia-targeting strategies and current advances in head and neck cancer. **Translational Oncology**, v. 14, n. 3, p. 101017, 2021.
- CONDEELIS, J.; POLLARD, J. W. Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell**, v. 124, n. 2, p. 263–266, 2006.
- COSSARIZZA, A. et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. **European Journal of Immunology**, v. 47, n. 10, p. 1584–1797, 2017.
- CUERVO, A. M. Autophagy: In sickness and in health. **Trends in Cell Biology**, v. 14, n. 2, p. 70–77, 2004.
- CUMBERBATCH MG, ROTA M, CATTO JW, ET. AL. The role of tobacco smoke in bladder and kidney carcinogenesis. **Eur Urol**, v. 70, n. 458, 2016.
- DAEI, S. et al. Anticancer Effects of Gold Nanoparticles by Inducing Apoptosis in Bladder Cancer 5637 Cells. **Biological Trace Element Research**, n. 0123456789, 2021.
- DA COSTA, J. P. DE C. et al. Electron beam irradiation for the formation of thick Ag film on Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. **RSC Advances**, v. 10, n. 37, p. 21745–21753, 2020.
- DA SILVA, L. F. et al. A novel ozone gas sensor based on one-dimensional (1D)  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>



nanostructures. **Nanoscale**, v. 6, n. 8, p. 4058–4062, 2014.

DA SILVA, L. F. et al. Acetone gas sensor based on  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> nanorods obtained via a microwave-assisted hydrothermal route. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 683, p. 186–190, 2016.

DAYEM, A. A. et al. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 1–21, 2017.

DENARDO, D. G. et al. CD4<sup>+</sup> T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages. **Cancer Cell**, v. 16, n. 2, p. 91–102, 2009.

DE FOGGI, C. C. et al. Tuning the morphological, optical, and antimicrobial properties of  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> microcrystals using different solvents. **Crystal Growth and Design**, v. 17, n. 12, p. 6239–6246, 2017.

DE FOGGI, C. C. et al. Unveiling the role of  $\beta$ -Ag<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> microcrystals to the improvement of antibacterial activity. **Materials Science and Engineering: C**, v. 111, p. 110765, 2020.

DE STEFANO, D.; CARNUCCIO, R.; MAIURI, M. C. Nanomaterials Toxicity and Cell Death Modalities. **Journal of Drug Delivery**, v. 2012, p. 1–14, 2012.

DEWAELE, M.; MAES, H.; AGOSTINIS, P. ROS-mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy. **Autophagy**, v. 6, n. 7, p. 838–854, 2010.

DINNEY, C. P. N. et al. Focus on bladder cancer. v. 6, n. August, p. 111–116, 2004.

DONG, Z. et al. Silver nanoparticles immobilized on fibrous nano-silica as highly efficient and recyclable heterogeneous catalyst for reduction of 4-nitrophenol and 2-nitroaniline. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 158–159, p. 129–135, 2014.

DRAYTON, R. M. et al. Reduced expression of miRNA-27a modulates cisplatin resistance in bladder cancer by targeting the cystine/glutamate exchanger SLC7A11. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 7, p. 1990–2000, 2014.

DUNCAN, R.; IZZO, L. Dendrimer biocompatibility and toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 15, p. 2215–2237, 2005.

DUSCHL, A. Nanomedicine. In: **Immune Rebalancing: The Future of Immunosuppression**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. p. 251–274.

EGBUNA, C. et al. Toxicity of Nanoparticles in Biomedical Application : Nanotoxicology. v. 2021, 2021.

EL BADAWY, A. M. et al. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 283–287, 2011.

ELDER, A. et al. Does nanoparticle activity depend upon size and crystal phase ? v. 2, n. March, 2008.

ELSAESSER, A.; HOWARD, C. V. Toxicology of nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 2, p. 129–137, 2012.

ERDOGAR, N. et al. Prolonged retention and in vivo evaluation of cationic nanoparticles loaded with Mitomycin C designed for intravesical chemotherapy of bladder tumours. **Journal of Microencapsulation**, v. 29, n. 6, p. 576–582, 2012.

ERDOGAR, N. et al. Cationic core-shell nanoparticles for intravesical chemotherapy in tumor-induced rat model: Safety and efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, n. 1–2, p. 1–9, 2014.

FABIAN, E. et al. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. **Archives of Toxicology**, v. 82, n. 3, p. 151–157, 2008.

FAN, J. et al. Direct evidence for catalase and peroxidase activities of ferritin-platinum nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 6, p. 1611–1618, 2011.

FAN, Z. et al. NK-cell activation by LIGHT triggers tumor-specific CD8<sup>+</sup> T-cell immunity to reject established tumors. v. 107, n. 4, p. 1342–1352, 2016.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide : Sources , methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. v. 386, 2015.

FERREIRA, L. A. B. et al. Biogenic silver nanoparticles: In vitro and in vivo antitumor activity in bladder cancer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 151, n. March, p. 162–170, 2020.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 3, p. 161–171, 2005.

FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nature reviews cancer**, v. 3, n. 6, p. 453–458, 2003.

FLIPPOT, R. et al. Long non-coding RNAs in genitourinary malignancies: a whole new world. **Nature Reviews Urology**, v. 16, n. 8, p. 484–504, 2019.

FOGGI, C. C. et al. Synthesis and evaluation of  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> as novel antifungal agent. **Chemical Physics Letters**, v. 674, p. 125–129, 2017.

FONG, M. H. Y. et al. Update on bladder cancer molecular subtypes. **Translational Andrology and Urology**, v. 9, n. 6, p. 2881–2889, 2020.

FOOTE, C. S. Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. **Science (New York, N.Y.)**, v. 162, n. 3857, p. 963–70, 1968.

FRANCATTO, P. et al. Enhanced reactivity of peroxo-modified surface of titanium dioxide nanoparticles used to synthesize ultrafine bismuth titanate powders at lower temperatures. **Ceramics International**, v. 42, n. 14, p. 15767–15772, 2016.

FRANCIS, A. P.; DEVASENA, T. Toxicity of carbon nanotubes: A review. **Toxicology and Industrial Health**, v. 34, n. 3, p. 200–210, 2018.

FRANK SHAW, C. Gold-Based Therapeutic Agents. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2589–2600, 1999.

FRICKER, S. P. Medical uses of gold compounds: Past, present and future. **Gold Bulletin**, v. 29, n. 2, p. 53–60, 1996.

FUJITA, N. et al. Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of Bcl-X(L) protein by caspase-3-like proteases. **Oncogene**, v. 17, n. 10, p. 1295–1304, 1998.

GAO, Q. et al. Gold Nanoparticles in Cancer Theranostics. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, n. April, p. 1–20, 2021.

GALON, J.; BRUNI, D. Tumor Immunology and Tumor Evolution: Intertwined Histories. **Immunity**, v. 52, n. 1, p. 55–81, 2020.

GARCÉS, M. et al. Current understanding of nanoparticle toxicity mechanisms and interactions with biological systems. **New Journal of Chemistry**, v. 45, n. 32, p. 14328–14344, 2021.

GEORGE, M. et al. Epidemiology of Bladder Cancer : A Systematic Review and Contemporary Update of Risk Factors in 2018. **European Urology**, p. 1–12, 2018.

GESO, M. Nanoparticle augmented radiation treatment decreases cancer cell proliferation. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 9, n. 2, p. 302–303, 2013.

GHERASIM, O.; FICAI, A.; ANDRONESCU, E. Biomedical Applications of Silver Nanoparticles : An Up-to-Date Overview. p. 1–25, 2018.

GONCIAR, D. et al. Nanotechnology in metastatic cancer treatment: Current achievements and future research trends. **Journal of Cancer**, v. 10, n. 6, p. 1358–1369, 2019.

GOOSSENS, V. et al. Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 18, p. 8115–8119, 1995.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 12, p. 931–947, 2013.

GOZUACIK, D.; KIMCHI, A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. **Oncogene**, v. 23, n. 16 REV. ISS. 2, p. 2891–2906, 2004.

GRAEBER, T. G. et al. **Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours** *Nature*, 1996.

GRATTON, S. E. A. et al. The effect of particle design on cellular internalization pathways. v. 105, n. 33, 2008.

GREEN, S. L.; FREIBERG, R. A.; GIACCIA, A. J. p21 Cip1 and p27 Kip1 Regulate Cell Cycle Reentry after Hypoxic Stress but Are Not Necessary for Hypoxia-Induced Arrest . **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 4, p. 1196–1206, 2001.

GRIVAS, P.; YU, E. Y. Role of Targeted Therapies in Management of Metastatic Urothelial Cancer in the Era of Immunotherapy. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 20, n. 8, 2019.

GRIVENNIKOV, S. I. et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. **Nature**, v. 491, n. 7423, p. 254–258, 2012.

GUPTA, G. P.; MASSAGUÉ, J. Cancer metastasis: building a framework. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 679–695, 2006.

GURUNATHAN, S. et al. Cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in MDA-MB-231 human breast cancer cells. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HAO, N. B. et al. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

HADJUR, C. et al. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta(tetrahydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by m-THPC. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 45, n. 2–3, p. 170–178, 1998.

HARO CHÁVEZ, N. L. et al. Promising effects of silver tungstate microcrystals on fibroblast human cells and three dimensional collagen matrix models: A novel non-cytotoxic material to fight oral disease. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 170, p. 505–513, 2018.

HCT, C. et al. Cytotoxic Potential and Molecular Pathway Analysis of Silver Nanoparticles in Human Colon Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, 2018.

HE, C.; LU, J.; LIN, W. Hybrid nanoparticles for combination therapy of cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 224–236, 2015.

HEMPEL, N. et al. Altered redox status accompanies progression to metastatic human bladder cancer. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 1, p. 42–50, 2009.

HENDERSON, W.; DOUGHERTY, J. HOW DOES PHOTODYNAMIC THERAPY WORK ? v. 55, n. 1, p. 145–157, 1992.

HERR, H. W. The value of a second transurethral resection in evaluating patients with bladder tumors. **Journal of Urology**, v. 162, n. 1, p. 74–76, 1999.

HEUSINKVELD, M. et al. M2 Macrophages Induced by Prostaglandin E 2 and IL-6 from Cervical Carcinoma Are Switched to Activated M1 Macrophages by CD4 + Th1 Cells . **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 3, p. 1157–1165, 2011.

HICKS, R. M. The mammalian urinary bladder: an accommodating organ. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 50, n. 2, p. 215–246, 1975.

HINOJOS-MÁRQUEZ, E. A. et al. Antimicrobial activity of silver nanoparticles in polycaprolactone nanofibers against Gram-positive and negative bacteria. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 2016.

HUMPHREYS, D. T.; WILSON, M. R. Modes of L929 cell death induced by TNF- $\alpha$  and other cytotoxic agents. **Cytokine**, v. 11, n. 10, p. 773–782, 1999.

HUA, X. et al. Porous Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> microtubes with improved photocatalytic properties. **Catalysis Communications**, v. 52, p. 49–52, 2014.

HUMPHREYS, D. T.; WILSON, M. R. Modes of L929 cell death induced by TNF- $\alpha$  and other cytotoxic agents. **Cytokine**, v. 11, n. 10, p. 773–782, 1999.

HUSSAIN, S. et al. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: Role of particle surface area and internalized amount. **Toxicology**, v. 260, n. 1–3, p. 142–149, 2009.

IMANI, R. et al. Combined cytotoxic effect of UV-irradiation and TiO<sub>2</sub> microbeads in normal urothelial cells, low-grade and high-grade urothelial cancer cells. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 14, n. 3, p. 583–590, 2015.

IVANKOVIC, S. et al. The antitumor activity of thymoquinone and thymohydroquinone in vitro and in vivo. **Experimental Oncology**, v. 28, n. 3, p. 220–224, 2006.

JAIN, J. et al. Silver Nanoparticles in Therapeutics. **Molecular pharmaceuticals**, v. 6, n. 5, p. 1388–1401, 2009.

JAIN, S.; HIRST, D. G.; O’SULLIVAN, J. M. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. **British Journal of Radiology**, v. 85, n. 1010, p. 101–113, 2012.

JIANG, M. et al. Identification of a Hypoxia-Related Signature for Predicting Prognosis and the Immune Microenvironment in Bladder Cancer. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, n. May, p. 1–13, 2021.

JEONG, S. Y. et al. Enhancement of radiotherapeutic effectiveness by temperature-sensitive liposomal 1-methylxanthine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, n. 1–2, p. 132–139, 2009.

JEONG, Y.; LIM, D. W.; CHOI, J. Assessment of Size-Dependent Antimicrobial and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2014, 2014.

JIN, C. et al. Application of nanotechnology in cancer diagnosis and therapy - A mini-review. **International Journal of Medical Sciences**, v. 17, n. 18, p. 2964–2973, 2020.

JOHNSTON, H. J. et al. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 40, n. 4, p. 328–346, 2010.

JOURNAL, A. I. et al. Biogenic synthesis of AgNPs using Artemisia oliveriana extract and their biological activities for an effective treatment of lung cancer Biogenic synthesis of AgNPs using Artemisia oliveriana extract and their biological activities for an effective treatment of lung cancer. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 46, n. S3, p. S1047–S1058, 2018.

KAGAN, V. E.; BAYIR, H.; SHVEDOVA, A. A. Nanomedicine and nanotoxicology: two sides of the same coin. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 1, n. 4, p. 313–316, 2005.

KELTS, J. L. et al. Altered cytotoxicity of ROS-inducing compounds by sodium pyruvate in cell culture medium depends on the location of ROS generation. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, 2015.

KALISHWARALAL, K. et al. Silver nano - A trove for retinal therapies. **Journal of Controlled Release**, v. 145, n. 2, p. 76–90, 2010.

KASHYAP, D. et al. Natural product-based nanoformulations for cancer therapy : Opportunities and challenges. **Seminars in Cancer Biology**, n. June, p. 1–19, 2019.

KELTS, J. L. et al. Altered cytotoxicity of ROS-inducing compounds by sodium pyruvate in cell culture medium depends on the location of ROS generation. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, 2015.

KENNEDY, J. PHOTODYNAMIC THERAPY WITH ENDOGENOUS PROTOPORPHYRIN IX : B A S I C P R I N C I P L E S A N D P R E S E N T C L I N I C A L EXPERIENCE \*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 6, p. 143–148, 1990.

KENIFIC, C. M. et al. NBR 1 enables autophagy-dependent focal adhesion turnover. **Journal of Cell Biology**, v. 212, n. 5, p. 577–590, 2016.

KESSEL, D. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 1, n. 11, p. 837–840, 2002.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52–67, 2010.

KHANDELWAL, P.; ABRAHAM, S. N.; APODACA, G. Cell biology and physiology of the uroepithelium. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 297, n. 6, 2009.

KHURANA, M. et al. Drug and light dose responses to focal photodynamic therapy of single blood vessels in vivo. **Journal of Biomedical Optics**, v. 14, n. 6, p. 064006, 2009.

KIM, S.; RYU, D. Silver nanoparticle-induced oxidative stress , genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. n. August 2012, p. 78–89, 2013.

KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 95–101, 2007.

KIM, Y. S. et al. Insights into the dichotomous regulation of SOD2 in cancer. **Antioxidants**, v. 6, n. 4, p. 1–25, 2017.

KNIGHT, M. W. et al. Photodetection with active optical antennas. **Science**, v. 332, n. 6030, p. 702–704, 2011.

KIRKALI, Z. et al. Bladder cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis. **Urology**, v. 66, n. 6 SUPPL. 1, p. 4–34, 2005.

KNOWLES, M. A.; HURST, C. D. Molecular biology of bladder cancer: New insights into pathogenesis and clinical diversity. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 1, p. 25–41, 2015.

KONDO, Y. et al. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 9, p. 726–734, 2005.

KONG, L. et al. Deletion of interleukin-6 in monocytes/macrophages suppresses the initiation of hepatocellular carcinoma in mice. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 1–11, 2016.

KOVÁCS, D. et al. Silver nanoparticles defeat p53-positive and p53-negative osteosarcoma cells by triggering mitochondrial stress and apoptosis. **Scientific Reports**, n. May, p. 1–13, 2016.

KVITEK, L. et al. Initial study on the toxicity of silver nanoparticles (NPs) against *Paramecium caudatum*. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 11, p. 4296–4300, 2009.

LAIER, L. O. et al. Surface-dependent properties of  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>: a joint experimental and theoretical investigation. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 139, n. 7, p. 1–11, 2020.

LANONE, S.; BOCZKOWSKI, J. Biomedical Applications and Potential Health Risks of Nanomaterials: Molecular Mechanisms. **Current Molecular Medicine**, v. 6, n. 6, p. 651–663, 2006.

LAVELLE, J. et al. Bladder permeability barrier: Recovery from selective injury of surface epithelial cells. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 283, n. 2 52-2, p. 242–253, 2002.

LEIBOVITCH, I. et al. The significance of ureteral obstruction in Invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **Journal of Surgical Oncology**, v. 52, n. 1, p. 31–35, 1993.

LENIS, A. T.; LEC, P. M.; CHAMIE, K. Bladder cancer a review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 324, n. 19, p. 1980–1991, 2020.

LEVINE, B.; YUAN, J. Autophagy in cell death: An innocent convict? **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 10, p. 2679–2688, 2005.

LEWIS, S. A.; EATON, D. C.; DIAMOND, J. M. The mechanism of Na<sup>+</sup> transport by rabbit urinary bladder. **The Journal of Membrane Biology**, v. 28, n. 1, p. 41–70, 1976.

LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R. Cytotoxicity of nanoparticles. **Small**, v. 4, n. 1, p. 26–49, 2008.

LI, H. et al. Matrix metalloproteinase responsive, proximity-activated polymeric nanoparticles for siRNA delivery. **Advanced Functional Materials**, v. 23, n. 24, p. 3040–3052, 2013.

LI, J. J. et al. Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, n. 23, p. 5996–6003, 2010.

LI, K.; ZHANG, F. S. A novel approach for preparing silver nanoparticles under electron beam irradiation. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 4, p. 1423–1428, 2010.

LI, Q. et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. **Water Research**, v. 42, n. 18, p. 4591–4602, 2008.

LI, Y. et al. Silver nanoparticle based codelivery of oseltamivir to inhibit the activity of the H1N1 influenza virus through ROS-mediated signaling pathways. **ACS applied materials & interfaces**, v. 8, n. 37, p. 24385–24393, 2016.

LIANG, F. et al. Urothelial hinge as a highly specialized membrane: Detergent-insolubility, urohingin association, and in vitro formation. **Differentiation**, v. 65, n. 1, p. 59–69, 1999.

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 211–218, 2016.

LIN, L. et al. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes angio-genesis in breast cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 33, p. 34758–34773, 2015.

LIU, F. et al. Gold nanoparticles suppressed proliferation, migration, and invasion in papillary thyroid carcinoma cells via downregulation of CCT3. **Journal of Nanomaterials**, v. 2019, 2019.

LIU, J.-K. et al. Controlled synthesis of silver phosphate crystals with high photocatalytic activity and bacteriostatic activity. **CrystEngComm**, v. 14, n. 24, p. 8714–8721, 2012a.

LIU, Y.; GUO, J.; HUANG, L. Modulation of tumor microenvironment for immunotherapy: Focus on nanomaterial-based strategies. **Theranostics**, v. 10, n. 7, p. 3099–3117, 2020.

LIU, Y. R. et al. Enhanced metastatic potential in the MB49 urothelial carcinoma model. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.

LOCATI, M.; MANTOVANI, A.; SICA, A. **Macrophage Activation and Polarization as an Adaptive Component of Innate Immunity**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 120

LONGO, E. et al. Direct in situ observation of the electron-driven synthesis of Ag filaments on  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> crystals. **Scientific Reports**, v. 3, p. 4–7, 2013.

LONGO, V. M. et al. Potentiated Electron Transference in  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> Microcrystals with Ag Nanofilaments as Microbial Agent. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 118, n. 31, p. 5769–5778, ago. 2014.

LONGMIRE, M.; CHOYKE, P. L.; KOBAYASHI, H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: Considerations and caveats. **Nanomedicine**, v. 3, n. 5, p. 703–717, 2008.



LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. **Journal of Cell Biology**, v. 196, n. 4, p. 395–406, 2012.

LUKIANOVA-HLEB, E. Y. et al. Cell-specific transmembrane injection of molecular cargo with gold nanoparticle-generated transient plasmonic nanobubbles. **Biomaterials**, v. 33, n. 21, p. 5441–5450, 2012.

LUO, L. et al. Visible photocatalysis and photostability of Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> photocatalyst. **Applied Surface Science**, v. 319, p. 332–338, 2014.

MADEB, R.; MESSING, E. M. Gender, racial and age differences in bladder cancer incidence and mortality. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 22, n. 2, p. 86–92, 2004.

MAEDA, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: The key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 41, n. 1, p. 189–207, 2001.

MAEDA, H. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond. **Journal of Controlled Release**, v. 164, n. 2, p. 138–144, 2012.

MAGNANI, N. D. et al. Role of Mitochondria in the Redox Signaling Network and Its Outcomes in High Impact Inflammatory Syndromes. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, n. September, p. 1–15, 2020.

MAILLARD, J. Y.; HARTEMANN, P. Silver as an antimicrobial: facts and gaps in knowledge. **Critical reviews in microbiology**, v. 39, n. 4, p. 373–383, 2013.

MALAM, Y.; LOIZIDOU, M.; SEIFALIAN, A. M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 11, p. 592–599, 2009.

MAILLARD, J. Y.; HARTEMANN, P. Silver as an antimicrobial: facts and gaps in knowledge. **Critical reviews in microbiology**, v. 39, n. 4, p. 373–383, 2013.

MANSOORI, G. A.; SOELAIMAN, T. A. F. Nanotechnology - An introduction for the standards community. **Journal of ASTM International**, v. 2, n. 6, p. 17–38, 2005.

MAO, B. et al. Silver nanoparticles have lethal and sublethal adverse effects on development and longevity by inducing ROS-mediated stress responses. **Scientific Reports**, n. 500, p. 1–16, 2018.

MARLENA S. FEJZOA FREDERIC PAIK SCHOENBERGB, KIMBER MACGIBBONC, PATRICK MULLIND, ROBERTO ROMEROE, F, AND KHALIL TABSHA AUNIVERSITY, A. M. 基因的改变 NIH Public Access. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.

MARTINS, W. K. et al. Rapid screening of potential autophagic inductor agents using mammalian cell lines. **Biotechnology Journal**, v. 8, n. 6, p. 730–737, 2013.

MARTINS, W. K. et al. Parallel damage in mitochondrial and lysosomal compartments promotes efficient cell death with autophagy: The case of the pentacyclic triterpenoids. **Scientific Reports**, v. 5, n. October 2014, p. 1–17, 2015.

MATULEWICZ, R. S.; STEINBERG, G. D. Non-muscle-invasive Bladder Cancer: Overview and Contemporary Treatment Landscape of Neoadjuvant Chemoablative Therapies. **Reviews in urology**, v. 22, n. 2, p. 43–51, 2020.

MASSAGUÉ, J.; OBENAUF, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 298–306, 2016.

MCCONKEY, D. J.; CHOI, W. Molecular Subtypes of Bladder Cancer. **Current Oncology Reports**, v. 20, n. 10, p. 1–7, 2018.

MCKEOWN, S. R. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours - Implications for treatment response. **British Journal of Radiology**, v. 87, n. 1035, p. 1–12, 2014.

MEANEY, C.; RHEBERGEN, S.; KOHANDEL, M. In silico analysis of hypoxia activated prodrugs in combination with anti angiogenic therapy through nanocell delivery. **PLoS Computational Biology**, v. 16, n. 5, p. 1–21, 2020.

MILLS, C. D. M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease. **Critical Reviews in Immunology**, v. 32, n. 6, p. 463–488, 2012.

MILORD, R. A.; LECKSELL, K.; EPSTEIN, J. I. An objective morphologic parameter to aid in the diagnosis of flat urothelial carcinoma in situ. **Human Pathology**, v. 32, n. 9, p. 997–1002, 2001.

MILOWSKY, M. I. et al. Guideline on muscle-invasive and metastatic bladder cancer (European Association of Urology guideline): American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline endorsement. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 16, p. 1945–1952, 2016.

MINASSIAN, L. M. et al. Hypoxia-induced resistance to chemotherapy in cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1136, p. 123–139, 2019.

MISSAOUI, W. N.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. Toxicological status of nanoparticles: What we know and what we don't know. **Chemico-Biological Interactions**, v. 295, p. 1–12, 2018.

MITRA, A. P.; COTE, R. J. Molecular screening for bladder cancer: Progress and potential. **Nature Reviews Urology**, v. 7, n. 1, p. 11–20, 2010.

MITRANO, D. M. et al. Subscriber access provided by CARLETON UNIVERSITY Presence of Nanoparticles in Wash Water from Conventional Silver and Nano-Silver Textiles. 2014.

- MOAN, J.; BERG, K. the Photodegradation of Porphyrins in Cells Can Be Used To Estimate the Lifetime of Singlet Oxygen. **Photochemistry and Photobiology**, v. 53, n. 4, p. 549–553, 1991.
- MONDEGO, M. et al. Blue and red light photoluminescence emission at room temperature from CaTiO<sub>3</sub> decorated with  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>. **Ceramics International**, v. 43, n. 7, p. 5759–5766, 2017.
- MOOSAVI, M. A. et al. Photodynamic N-TiO<sub>2</sub> nanoparticle treatment induces controlled ROS-mediated autophagy and terminal differentiation of leukemia cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. September, p. 1–16, 2016.
- MROZ, P. et al. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. **Cancers**, v. 3, n. 2, p. 2516–2539, 2011.
- MUNN, L. L.; JAIN, R. K. Vascular regulation of antitumor immunity. **Science**, v. 365, n. 6453, p. 544–545, 2019.
- MUSETTI, S.; HUANG, L. Nanoparticle-Mediated Remodeling of the Tumor Microenvironment to Enhance Immunotherapy. **ACS Nano**, v. 12, n. 12, p. 11740–11755, 2018.
- NAYAK, D. IMPEDING A. TARGET SKIN CARCINOMA BY INDUCING MITOCHONDRIAL MEMBRANE DEPolarIZATION MEDIATED THROUGH ROS PRODUCTION B. IMPEDING A. TARGET SKIN CARCINOMA BY INDUCING MITOCHONDRIAL MEMBRANE DEPolarIZATION MEDIATED THROUGH ROS PRODUCT et al. Biofilm impeding AgNPs target skin carcinoma by inducing mitochondrial membrane depolarization mediated through ROS production. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, 2016.
- NEGRETE, H. O. et al. Permeability properties of the intact mammalian bladder epithelium. **American Journal of Physiology - Renal Fluid and Electrolyte Physiology**, v. 271, n. 4 40-4, 1996.
- NEL, A. et al. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622 LP – 627, fev. 2006.
- NIELSEN, M. E. et al. Trends in stage-specific incidence rates for urothelial carcinoma of the bladder in the United States: 1988 to 2006. **Cancer**, v. 120, n. 1, p. 86–95, 2014.
- NIKALJE, A. P. Nanotechnology and its Applications in Medicine. **Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 81–89, 2015.
- NIKOLETOPOULOU, V. et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3448–3459, 2013.

NOGUEIRA, A. E. et al. New approach of the oxidant peroxo method (OPM) route to obtain Ti(OH)<sub>4</sub> nanoparticles with high photocatalytic activity under visible radiation. **International Journal of Photoenergy**, v. 2018, p. 1–23, 2018.

NOSSIER, A. I. et al. Direct detection of hyaluronidase in urine using cationic gold nanoparticles: A potential diagnostic test for bladder cancer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 54, p. 7–14, 2014.

NOTTE, A.; LECLERE, L.; MICHIELS, C. Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 5, p. 427–434, 2011.

NOWICKA, A. M. et al. Progress in targeting tumor cells by using drug-magnetic nanoparticles conjugate. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 3, p. 828–833, 2013.

OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. v. 4, 1997.

OKABE, Y.; MEDZHITOV, R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. **Cell**, v. 157, n. 4, p. 832–844, 2014.

OLIVEIRA, L. P. et al. Increasing the photocatalytic and fungicide activities of Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> microcrystals under visible-light irradiation. **Ceramics International**, 2021.

OLIVEIRA, M. B.; VILLA NOVA, M.; BRUSCHI, M. L. A review of recent developments on micro/nanostructured pharmaceutical systems for intravesical therapy of the bladder cancer. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 23, n. 1, p. 1–12, 2018.

ONODERA, A. et al. Short-term changes in intracellular ROS localisation after the silver nanoparticles exposure depending on particle size. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 574–579, 2015.

ORABI, H. et al. Tissue engineering of urinary bladder and urethra: Advances from bench to patients. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

ORRENIUS, S.; NICOTERA, P.; ZHIVOTOVSKY, B. Cell Death Mechanisms and Their Implications in Toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 119, n. 1, p. 3–19, set. 2010.

PAINO, I. M. M. et al. Cyto and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology Letters**, v. 215, n. 2, p. 119–125, 2012.

PAN, Y. et al. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. **Small**, v. 5, n. 18, p. 2067–2076, 2009.

PANIERI, E.; SANTORO, M. M. Ros homeostasis and metabolism: A dangerous liason in cancer cells. **Cell Death and Disease**, v. 7, n. 6, p. 1–12, 2016.

PARRA-ROBERT, M. et al. Beyond the scavenging of reactive oxygen species (Ros): Direct effect of cerium oxide nanoparticles in reducing fatty acids content in an in vitro model of

hepatocellular steatosis. **Biomolecules**, v. 9, n. 9, 2019.

PIMENTEL, B. N. A. DA S. et al. Antifungal activity and biocompatibility of  $\alpha$ -AgVO<sub>3</sub> microcrystals: A promising material against oral Candida disease. **Materials Science and Engineering: C**, v. 108, p. 110405, 2020.

PARAMASIVAM, G. et al. Anisotropic noble metal nanoparticles: Synthesis, surface functionalization and applications in biosensing, bioimaging, drug delivery and theranostics. **Acta Biomaterialia**, v. 49, p. 45–65, 2017.

PARK, K. H. et al. Single-walled Carbon Nanotubes Are a New Class of Ion Channel Blockers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 50, p. 50212–50216, 2003.

PARKIN, D. M. The global burden of urinary bladder cancer. **Scandinavian journal of urology and nephrology. Supplementum**, v. 42, n. 218, p. 12–20, 2008.

PERILLO, B. et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 52, n. 2, p. 192–203, 2020.

PHOGAT, N.; KOHL, M.; UDDIN, I. **Interaction of Nanoparticles With Biomolecules, Protein, Enzymes, and Its Applications**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

PINO, P. DEL et al. Protein corona formation around nanoparticles - From the past to the future. **Materials Horizons**, v. 1, n. 3, p. 301–313, 2014.

POLETAJEW, S.; ZAPAŁA, P.; RADZISZEWSKI, P. Safety and Efficacy of Intravesical Bacillus Calmette-Guérin Immunotherapy in Patients with Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer Presenting with Asymptomatic Bacteriuria: A Systematic Review. **Urologia Internationalis**, v. 99, n. 1, p. 1–5, 2017.

PRABHAKAR, U. et al. Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. **Cancer Research**, v. 73, n. 8, p. 2412–2417, 2013.

PRADHAN, N.; PAL, A.; PAL, T. Catalytic reduction of aromatic nitro compounds by coinage metal nanoparticles. **Langmuir**, v. 17, n. 5, p. 1800–1802, 2001.

PRASAD, S.; GUPTA, S. C.; TYAGI, A. K. Reactive oxygen species ( ROS ) and cancer : role of antioxidative nutraceuticals. **Cancer Letters**, 2016.

PREMKUMAR, J. et al. Synthesis of Silver Nanoparticles (AgNPs) from Cinnamon against Bacterial Pathogens. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2018.

PRENEN, H.; MAZZONE, M. Tumor-associated macrophages: a short compendium. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 8, p. 1447–1458, 2019.

RAFEHI, H. et al. Clonogenic assay: Adherent cells. **Journal of Visualized Experiments**, n. 49, p. 15–17, 2011.

RAILKAR, R.; AGARWAL, P. K. Photodynamic Therapy in the Treatment of Bladder Cancer: Past Challenges and Current Innovations. **European Urology Focus**, v. 4, n. 4, p. 509–511,

2018.

RAJENDRAKUMAR, S. K. et al. Nanoparticle-Based Phototriggered Cancer Immunotherapy and Its Domino Effect in the Tumor Microenvironment. **Biomacromolecules**, v. 19, n. 6, p. 1869–1887, 2018.

REICHEL, D.; TRIPATHI, M.; PEREZ, J. M. Biological effects of nanoparticles on macrophage polarization in the tumor microenvironment. **Nanotheranostics**, v. 3, n. 1, p. 66–88, 2019.

REINERS, J. J. et al. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. **Autophagy**, v. 6, n. 1, p. 7–18, 2010.

RICHTERS, A.; ABEN, K. K. H.; KIEMENEY, L. A. L. M. The global burden of urinary bladder cancer: an update. **World Journal of Urology**, v. 38, n. 8, p. 1895–1904, 2020.

RIBEIRO, L. S. et al. A new strategy to obtain nano-scale particles of lithium titanate (Li<sub>4</sub>Ti<sub>5</sub>O<sub>12</sub>) by the oxidant peroxo method (OPM). **Ceramics International**, v. 45, n. 18, p. 23917–23923, 2019.

ROCA, R. A. et al. Facet-dependent photocatalytic and antibacterial properties of  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> crystals: combining experimental data and theoretical insights. **Catalysis Science & Technology**, v. 5, p. 4091–4107, 2015.

ROTOMSKIS, R.; STRECKYTE, G.; BAGDONAS, S. Phototransformations of sensitizers. 1. Significance of the nature of the sensitizer in the photobleaching process and photoproduct formation in aqueous solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 39, n. 2, p. 167–171, 1997.

RYCAJ, K.; TANG, D. G. Cell-of-Origin of Cancer versus Cancer Stem Cells: Assays and Interpretations. **Cancer Research**, v. 75, n. 19, p. 4003–4011, 2015.

SAHA, S. et al. Photochemical green synthesis of calcium-alginate-stabilized ag and au nanoparticles and their catalytic application to 4-nitrophenol reduction. **Langmuir**, v. 26, n. 4, p. 2885–2893, 2010.

SALEHI, F. et al. Oxidative DNA damage induced by ROS-modulating agents with the ability to target DNA: A comparison of the biological characteristics of citrus pectin and apple pectin. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2018.

SALIEV, T. et al. Impact of electromagnetic fields on in vitro toxicity of silver and graphene nanoparticles. **Electromagnetic Biology and Medicine**, v. 38, n. 1, p. 21–31, 2019.

SANTOS, C. J. et al. Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> nanoparticles radiolabeled with technetium-99m: a potential new tool for tumor identification and uptake. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 323, n. 1, p. 51–59, 2020.

SARKAR, A. et al. Nano-copper induces oxidative stress and apoptosis in kidney via both extrinsic and intrinsic pathways. v. 290, p. 208–217, 2011.

SANLI, O. et al. Bladder cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1–19, 2017.

SCADUTO, R. C.; GROTYOHANN, L. W. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 1 I, p. 469–477, 1999.

SCHAEUBLIN, N. M. et al. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. **Nanoscale**, v. 3, n. 2, p. 410–420, 2011.

SCHMIDT, S. et al. Intravesical bacillus calmette-guérin versus mitomycin c for ta and t1 bladder cancer: Abridged summary of the cochrane review. **Investigative and Clinical Urology**, v. 61, n. 4, p. 349–354, 2020.

SHANMUGASUNDARAM, T. et al. Biocompatible silver, gold and silver/gold alloy nanoparticles for enhanced cancer therapy: In vitro and in vivo perspectives. **Nanoscale**, v. 9, n. 43, p. 16773–16790, 2017.

SCHMIDT-HANSEN, M.; BERENDSE, S.; HAMILTON, W. The association between symptoms and bladder or renal tract cancer in primary care: A systematic review. **British Journal of General Practice**, v. 65, n. 640, p. e769–e775, 2015.

SCHULZ, M. et al. Microenvironmental Regulation of Tumor Progression and Therapeutic Response in Brain Metastasis. **Frontiers in immunology**, v. 10, n. July, p. 1713, 2019.

SHARIFI, M. N. et al. Autophagy Promotes Focal Adhesion Disassembly and Cell Motility of Metastatic Tumor Cells through the Direct Interaction of Paxillin with LC3. **Cell Reports**, v. 15, n. 8, p. 1660–1672, 2016.

SHUKLA, R. et al. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. **Langmuir**, v. 21, n. 23, p. 10644–10654, 2005.

SEIDL, C. Targets for Therapy of Bladder Cancer. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 50, n. 2, p. 162–170, 2020.

SHARIAT, S. F.; MILOWSKY, M.; DROLLER, M. J. Bladder cancer in the elderly. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 27, n. 6, p. 653–667, 2009.

SHARMA, A.; GOYAL, A. K.; RATH, G. Recent advances in metal nanoparticles in cancer therapy. **Journal of Drug Targeting**, v. 26, n. 8, p. 617–632, 2018.

SHELLEY, M. D. et al. Intravesical gemcitabine therapy for non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC): A systematic review. **BJU International**, v. 109, n. 4, p. 496–505, 2012.

SHI, G. et al. Electron beam induced growth of silver nanoparticles. **Scanning**, v. 35, n. 2, p. 69–74, 2013.

SHINAGARE, A. B. et al. Metastatic pattern of bladder cancer: Correlation with the characteristics of the primary tumor. **American Journal of Roentgenology**, v. 196, n. 1, p. 117–122, 2011.

SHVEDOVA, A. A.; KAGAN, V. E.; FADEEL, B. Close encounters of the small kind: adverse effects of man-made materials interfacing with the nano-cosmos of biological systems. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 50, p. 63–88, 2010.

SIEMANN, D. W. The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. **Cancer Treatment Reviews**, v. 37, n. 1, p. 63–74, 2011.

SIGNORI, A. M. et al. Formation of catalytic silver nanoparticles supported on branched polyethyleneimine derivatives. **Langmuir**, v. 26, n. 22, p. 17772–17779, 2010.

SOARES, S. et al. Nanomedicine: Principles, properties, and regulatory issues. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. AUG, p. 1–15, 2018.

SOARES DA SILVA, J. et al.  $\alpha$ -AgVO<sub>3</sub> Decorated by Hydroxyapatite (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>): Tuning Its Photoluminescence Emissions and Bactericidal Activity. **Inorganic Chemistry**, 2019.

SIOUTAS, C.; DELFINO, R. J.; SINGH, M. Exposure assessment for atmospheric Ultrafine Particles (UFPs) and implications in epidemiologic research. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 8, p. 947–955, 2005.

SONG, C. et al. Photodynamic therapy induces autophagy-mediated cell death in human colorectal cancer cells via activation of the ROS/JNK signaling pathway. **Cell Death and Disease**, v. 11, n. 10, 2020.

SØRENSEN, B. S.; HORSMAN, M. R. Tumor Hypoxia: Impact on Radiation Therapy and Molecular Pathways. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. April, p. 1–11, 2020.

STAPF, M.; TEICHGRÄBER, U.; HILGER, I. Methotrexate-coupled nanoparticles and magnetic nanochemotherapy for the relapse-free treatment of T24 bladder tumors. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2793–2811, 2017.

STERN, M. C. et al. Polymorphisms in DNA repair genes, smoking, and bladder cancer risk: Findings from the International Consortium of Bladder Cancer. **Cancer Research**, v. 69, n. 17, p. 6857–6864, 2009.

STECKIEWICZ, K. P. et al. Shape-Depended Biological Properties of Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> Microparticles: Evaluation of Antimicrobial Properties and Cytotoxicity in In Vitro Model—Safety Assessment of Potential Clinical Usage. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, 2019.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.



STERN, M. C. et al. Polymorphisms in DNA Repair Genes, Smoking, and Bladder Cancer Risk: Findings from the International Consortium of Bladder Cancer. **Cancer Research**, ago. 2009.

SUR, I. et al. Interaction of multi-functional silver nanoparticles with living cells. **Nanotechnology**, v. 21, n. 17, 2010.

SURAPANENI, S. K.; BASHIR, S.; TIKOO, K. Gold nanoparticles-induced cytotoxicity in triple negative breast cancer involves different epigenetic alterations depending upon the surface charge. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

SWEENEY, S. K. et al. Nanotechnology and cancer: Improving real-time monitoring and staging of bladder cancer with multimodal mesoporous silica nanoparticles. **Cancer Nanotechnology**, v. 7, n. 1, 2016.

SYLVESTER, R. J. et al. Systematic Review and Individual Patient Data Meta-analysis of Randomized Trials Comparing a Single Immediate Instillation of Chemotherapy after Transurethral Resection with Transurethral Resection Alone in Patients with Stage pTa-pT1 Urothelial Carcinoma. **European Urology**, v. 69, n. 2, p. 231–244, 2016.

SYLVESTER, R. J.; OOSTERLINCK, W.; VAN DER MEIJDEN, A. P. M. A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: A meta-analysis of published results of randomized clinical trials. **Journal of Urology**, v. 171, n. 6 I, p. 2186–2190, 2004.

TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 9, p. 621–632, 2010.

TANG, C. et al. Functional Nanomedicines for Targeted Therapy of Bladder Cancer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. November, p. 1–17, 2021.

TANG, D. G. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. **Cell Research**, v. 22, n. 3, p. 457–472, 2012.

TANGUTOORI, S. et al. Simultaneous delivery of cytotoxic and biologic therapeutics using nanophotoactivatable liposomes enhances treatment efficacy in a mouse model of pancreatic cancer. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 223–234, 2016.

TANNOCK, I. F. Tumor physiology and drug resistance. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 20, n. 1–2, p. 123–132, 2001.

TIMOTEO, F. et al. Bladder cancer trends and mortality in the Brazilian public health system. **International Braz J Urol**, v. 46, n. 2, p. 224–233, 2020.

THOMÉ, M. P. et al. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 24, p. 4622–4632, 2016.

TOMLINSON, B. et al. Nanotechnology in bladder cancer: Current state of development and

clinical practice. **Nanomedicine**, v. 10, n. 7, p. 1189–1201, 2015.

TOWERS, C. G.; WODETZKI, D.; THORBURN, A. Autophagy and cancer: Modulation of cell death pathways and cancer cell adaptations. **Journal of Cell Biology**, v. 219, n. 1, p. 1–15, 2020.

TOMLINSON, B. et al. Nanotechnology in bladder cancer: Current state of development and clinical practice. **Nanomedicine**, v. 10, n. 7, p. 1189–1201, 2015.

T-T, S. Umbrella Cell — Surface Specialisations. **Functional Ultrastructure**, v. 500, n. 1999, p. 226–227, 2005.

TAUFFENBERGER, A.; MAGISTRETTI, P. J. Reactive Oxygen Species: Beyond Their Reactive Behavior. **Neurochemical Research**, v. 46, n. 1, p. 77–87, 2021.

TAVAKOLI, F. et al. Effects of nano-encapsulated curcumin-chrysin on telomerase , MMPs and TIMPs gene expression in mouse B16F10 melanoma tumour model. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2018.

TEDESCO, S. et al. Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. **Aquatic toxicology**, v. 100, n. 2, p. 178–186, 2010.

TRENCH, A. B. et al. Connecting structural, optical, and electronic properties and photocatalytic activity of Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:Mo complemented by DFT calculations. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 238, p. 198–211, 2018.

TOLAYMAT, T. M. et al. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 5, p. 999–1006, 2010.

TSAI, Y.-Y. et al. Identification of the nanogold particle-induced endoplasmic reticulum stress by omic techniques and systems biology analysis. **ACS nano**, v. 5, n. 12, p. 9354–9369, 2011.

TURNER, K. J. et al. The hypoxia-inducible genes VEGF and CA9 are differentially regulated in superficial vs invasive bladder cancer. **British Journal of Cancer**, v. 86, n. 8, p. 1276–1282, 2002.

UTHAMAN, S.; HUH, K. M.; PARK, I. K. Tumor microenvironment-responsive nanoparticles for cancer theragnostic applications. **Biomaterials Research**, v. 22, n. 1, p. 1–11, 2018.

VAN OSCH, F. H. M. et al. Quantified relations between exposure to tobacco smoking and bladder cancer risk: A meta-analysis of 89 observational studies. **International Journal of Epidemiology**, v. 45, n. 3, p. 857–870, 2016.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, 2006.

VASAN, N.; BASELGA, J.; HYMAN, D. M. A view on drug resistance in cancer. **Nature**, v. 575, n. 7782, p. 299–309, 2019.

VAUPEL, P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 14, n. 3, p. 198–206, 2004.

VESSELLA, R. L.; PANTEL, K.; MOHLA, S. Tumor cell dormancy: An NCI workshop report. **Cancer Biology and Therapy**, v. 6, n. 9, p. 1492–1500, 2007.

VISVADER, J. E. Cells of origin in cancer. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 314–322, 2011.

VISVADER, J. E.; LINDEMAN, G. J. Cancer stem cells in solid tumours: Accumulating evidence and unresolved questions. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 10, p. 755–768, 2008.

VIVERO-ESCOTO, J. L.; HUANG, Y. T. Inorganic-organic hybrid nanomaterials for therapeutic and diagnostic imaging applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 6, p. 3888–3927, 2011.

VOLLMER, P. et al. Novel pathogenic mechanism of microbial metalloproteinases: Liberation of membrane-anchored molecules in biologically active form exemplified by studies with the human interleukin-6 receptor. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 9, p. 3646–3651, 1996.

WANG, S. et al. Strategies to get drugs across bladder penetrating barriers for improving bladder cancer therapy. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 2, p. 1–14, 2021.

WANG, W.; MORIYAMA, L. T.; BAGNATO, V. S. Photodynamic therapy induced vascular damage: An overview of experimental PDT. **Laser Physics Letters**, v. 10, n. 2, 2013.

WALKEY, C. D. et al. Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 4, p. 2139–2147, 2012.

WEI, Y. et al. Polydopamine and peptide decorated doxorubicin-loaded mesoporous silica nanoparticles as a targeted drug delivery system for bladder cancer therapy. **Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 681–691, 2017.

WEIS, S. M.; CHERESH, D. A. Tumor angiogenesis: Molecular pathways and therapeutic targets. **Nature Medicine**, v. 17, n. 11, p. 1359–1370, 2011.

WELCH, D. R.; HURST, D. R. Defining the Hallmarks of Metastasis. **Cancer Research**, v. 79, n. 12, p. 3011–3027, 2019.

WENG, X. et al. Photodynamic therapy reduces metastasis of breast cancer by minimizing circulating tumor cells. **Biomedical Optics Express**, v. 12, n. 7, p. 3878, 2021.

WILSON, M. R. et al. Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 184, n. 3, p. 172–179, 2002.

WITJES, J. A. et al. European Association of Urology Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer : Summary of the 2020 Guidelines. p. 1–23, 2020.

WODKA, D. et al. Photocatalytic activity of titanium dioxide modified by silver nanoparticles. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 2, n. 7, p. 1945–1953, 2010.

WU, M. et al. Size-dependent cellular uptake and localization profiles of silver nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, 2019.

WU, A. et al. Morphology-controlled synthesis of Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> nano/microcrystals and their antibacterial properties. **Materials Research Bulletin**, v. 48, n. 9, p. 3043–3048, 2013.

WU, S. et al. Photocatalysis and degradation products identification of deoxynivalenol in wheat using upconversion nanoparticles@TiO<sub>2</sub> composite. **Food Chemistry**, v. 323, n. April, p. 126823, 2020.

WU, Q.; WONG, J. P. C.; KWOK, H. F. Putting the Brakes on Tumorigenesis with Natural Products of Plant Origin: Insights into the Molecular Mechanisms of Actions and Immune Targets for Bladder Cancer Treatment. **Cells**, v. 9, n. 5, 2020.

WYKOFF, C. C. et al. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. **Cancer Research**, v. 60, n. 24, p. 7075–7083, 2000.

XIA, Y. et al. Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: Simple chemistry meets complex physics? **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 48, n. 1, p. 60–103, 2009.

XIANG, D. et al. Inhibition of A/Human/Hubei/3/2005 (H3N2) influenza virus infection by silver nanoparticles in vitro and in vivo. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4103–4114, 2013.

XIE, H. et al. Novel PEI–AuNPs–MnIIIIPPIX nanocomposite with enhanced peroxidase-like catalytic activity in aqueous media. **Comptes Rendus Chimie**, v. 21, n. 2, p. 104–111, 2018.

XIU, Z. M. et al. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. **Nano Letters**, v. 12, n. 8, p. 4271–4275, 2012.

XU, L. et al. Theranostics Silver nanoparticles : Synthesis , medical applications and biosafety. v. 10, n. 20, 2020.

YANG, G. W. et al. Controllable deposition of Ag nanoparticles on carbon nanotubes as a catalyst for hydrazine oxidation. **Carbon**, v. 46, n. 5, p. 747–752, 2008.

YARROW, J. C. et al. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. **BMC Biotechnology**, v. 4, p. 1–9, 2004.

YEASMIN, S. et al. In-vitro anti-cancer activity of shape controlled silver nanoparticles (AgNPs) in various organ specific cell lines. **Journal of Molecular Liquids**, 2017.

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

YUE, P. Y. K. et al. A Simplified Method for Quantifying Cell Migration/Wound Healing in 96-Well Plates. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 15, n. 4, p. 427–433, 2010.

YALLAPU, M. M. et al. Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 351, n. 1, p. 19–29, 2010.

YANG, M. et al. The application of nanoparticles in cancer immunotherapy: Targeting tumor microenvironment. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 7, p. 1973–1987, 2021.

YANG, Y.; GUO, J.; HUANG, L. Tackling TAMs for Cancer Immunotherapy: It's Nano Time. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 41, n. 10, p. 701–714, 2020.

YOSHIDA, T. et al. Protein corona changes mediated by surface modification of amorphous silica nanoparticles suppress acute toxicity and activation of intrinsic coagulation cascade in mice. **Nanotechnology**, v. 26, n. 24, p. 245101, 2015.

YU, K. et al. Targeted drug delivery systems for bladder cancer therapy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 56, n. December 2019, p. 101535, 2020.

YUESHENG, Z. *Journal of Environmental Science and Health , Part C : Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews Understanding the Gender Disparity in Bladder Cancer Risk : The Impact of Sex Hormones and Liver on Bladder Susceptibility to Carcinogens.* n. December 2014, p. 37–41, 2014.

ZHANG, T. et al. Cytotoxic potential of silver nanoparticles. **Yonsei Medical Journal**, v. 55, n. 2, p. 283–291, 2014.

ZANGANEH, S. et al. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. **Nature Nanotechnology**, v. 11, n. 11, p. 986–994, 2016a.

ZANGANEH, S. et al. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. **Nature Nanotechnology**, v. 11, n. 11, p. 986–994, 2016b.

ZARGAR, H. et al. Optimizing intravesical mitomycin C therapy in non-muscle-invasive bladder cancer. **Nature Reviews Urology**, v. 11, n. 4, p. 220–230, 2014.

ZHANG, D. et al. A magnetic chitosan hydrogel for sustained and prolonged delivery of Bacillus Calmette-Guérin in the treatment of bladder cancer. **Biomaterials**, v. 34, n. 38, p. 10258–10266, 2013.

ZHANG, X. Q. et al. Interactions of nanomaterials and biological systems: Implications to personalized nanomedicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 13, p. 1363–1384, 2012.

ZHANG, X.; SHEN, W.; GURUNATHAN, S. Silver Nanoparticle-Mediated Cellular Responses in Various Cell Lines : An in Vitro Model. **International Journal of Molecular**

**Sciences**, p. 1–26, 2016.

ZHANG, X. Y. et al. Construction of silver tungstate multilevel sphere clusters by controlling the energy distribution on the crystal surface. **CrystEngComm**, v. 17, n. 5, p. 1129–1138, 2015.

ZHANG, Y. et al. Surface-Plasmon-Driven Hot Electron Photochemistry. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 6, p. 2927–2954, 2018.

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

ZHOU, Z. et al. Advances in photosensitizer-related design for photodynamic therapy. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 6, p. 668–686, 2021.

ZHU, C. et al. The contribution of tumor-Associated macrophages in glioma neo-Angiogenesis and implications for anti-Angiogenic strategies. **Neuro-Oncology**, v. 19, n. 11, p. 1435–1446, 2017.