



Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2023; 13:1-16. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2023.15>
Artigo Original. Recebido: 18/08/2022. Aceito: 31/05/2023. Publicado:27/06/2023. Chave: e2022-64.
<https://www.youtube.com/watch?v=vPcSyYwFCcQ>

Avaliação do efeito antiparasitário das nanopartículas de prata contra o *Trypanosoma cruzi* *in vitro*

Evaluation of antiparasitic effect of silver nanoparticles against *Trypanosoma cruzi* *in vitro*



Pescador-Rojas José¹ , Lucas-Gómez Misael² , Contreras-Ortiz Eloy³ ,
Vázquez-Chagoyán Juan³ , Bahena-Uribe Daniel⁴ , Aparicio-Burgos José^{1**} 

¹Escuela Superior de Apan, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. ²Doctorado en Nanociencias y Nanotecnología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México. ³Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, México. ⁴Laboratorio Avanzados de Nanoscopia Electrónica (LANE), Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México. *Autor responsable: José Alfredo Pescador-Rojas. **Autor para correspondência: José E. Aparicio-Burgos. Escuela Superior de Apan, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Carretera Apan- Calpulalpan Km. 8, Chimalpa Tlalayote S/N, C. P. 43920 Apan, Hidalgo, México. E-mail: josealfredo_pescador@uaeh.edu.mx, i.lucas@utvam.edu.mx, chema_coco12@yahoo.com.mx, jcvch@yahoo.com, dbahenau@cinvestav.mx, jose_aparicio@uaeh.edu.mx

Resumo

A tripanossomíase americana é uma das doenças tropicais negligenciadas globalmente e é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Tc). Atualmente, os medicamentos anti-Tc são limitados e não há vacina disponível. O objetivo do estudo foi determinar os efeitos das nanopartículas de prata (AgNPs) contra tripomastigotas das cepas Sylvio X10/4 (Tcl) e Esmeraldo (TcII). As AgNPs foram obtidas pelo método de redução e foi realizada uma caracterização estrutural. A atividade citotóxica das AgNPs (atividade anti-Tc) foi determinada pelo cálculo dos valores da metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀) em células HaCaT e parasitas. As AgNPs não apresentaram citotoxicidade contra as células HaCaT nos valores de IC₅₀ testados em parasitas, e a IC₅₀ tripomastigotas calculada foi de 4,05 µg/ml e 6,16 µg/ml para as cepas Tcl e TcII, respectivamente. As AgNPs foram mais ativas contra ambas as cepas de *Trypanosoma cruzi* do que o nifurtimox (400 µg/ml) em ensaios *in vitro*. Esses resultados estabelecem as bases para uma avaliação mais aprofundada das AgNPs, para investigar seu valor quimioterápico no combate à infecção por *T. cruzi* em modelos animais.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, Chagas, AgNP, *in vitro*, prata.

Abstract

American trypanosomiasis is one the globally neglected tropical disease, and is cause by the protozoan haemoflagellate *Trypanosoma cruzi* (Tc). Currently, the anti-Tc drugs are limited and no vaccine is available. The objective of the study was to determine the effects of silver nanoparticles (AgNPs) against trypomastigotes of the Sylvio X10/4 (Tcl) and Esmeraldo (TcII) strains. The AgNPs were obtained by the reduction method and a structural characterization was carried out. The cytotoxic activity of the AgNPs (anti-Tc activity) was determined by calculating the values of half the maximum inhibitory concentration (IC₅₀) in HaCaT cells and parasites. AgNPs showed no-cytotoxicity against HaCaT cells at the IC₅₀ values assayed in parasites, and the calculated IC₅₀ trypomastigotes was 4.05 µg/ml and 6.16 µg/ml for Tcl and TcII strains,



respectively. AgNPs were more active against both *Trypanosoma cruzi* strains than nifurtimox (400 µg/ml) *in vitro* assays. These results lay the groundwork for further evaluation of AgNPs, to investigate its chemotherapeutic value to fight *T. cruzi* infection in animal models.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Chagas, AgNP, *in vitro*, silver.

INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida (El-Sayed *et al.*, 2005). É o agente causador da tripanossomíase americana, uma doença parasitária transmitida por vetores e endêmica na América do Sul, América Central e México. O *T. cruzi* representa um grande problema de saúde pública, com aproximadamente 8 milhões de pessoas infectadas e 25 milhões em risco de infecção (Ibáñez-Cervantes *et al.*, 2018). Em 3-5 % dos pacientes agudamente afetados, a infecção pode resultar em várias condições: 1) miocardite, que pode evoluir para insuficiência cardíaca e morte; 2) lesões destrutivas de cardiomiócitos e nervos cardíacos, que também podem evoluir para insuficiência cardíaca; ou 3) meningoencefalite (James *et al.*, 2005). Em pacientes cronicamente infectados, a doença pode passar despercebida por vários anos, até que 20 a 35 % desses pacientes desenvolvam lesões irreversíveis do sistema nervoso autônomo. A doença de Chagas representa a principal causa de lesões cardíacas em adultos jovens e economicamente produtivos em países endêmicos (El-Sayed *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005).

Atualmente, as opções de tratamento são limitadas e não há vacina disponível para prevenir ou controlar a infecção pelo *T. cruzi*. Os medicamentos aprovados pela OMS para o tratamento da doença de Chagas, como o nifurtimox (NFMX) e o benznidazol (BNZ), têm pelo menos quatro desvantagens (Colantonio *et al.*, 2016). Primeiro, devido aos efeitos colaterais severos desses medicamentos, cerca de 40 % dos pacientes abandonam o tratamento. Em segundo lugar, esses medicamentos funcionam de forma mais eficaz durante a fase aguda da infecção; no entanto, como é difícil de detectar, a maioria das pessoas inicia o tratamento medicamentoso até que a fase crônica da doença tenha sido estabelecida, com a consequente redução da eficácia antiparasitária dos medicamentos (Colantonio *et al.*, 2016). Terceiro, o acesso público a medicamentos terapêuticos é limitado (Chaves *et al.*, 2017). Quarto, algumas cepas de *T. cruzi* são resistentes ao NFMX e ao BZN, o que torna sua eficácia abaixo do ideal (Toledo *et al.*, 2004). Esses fatores enfatizam a necessidade de desenvolver melhores medicamentos anti-*T. cruzi* e/ou novas estratégias de tratamento para a tripanossomíase americana.

As tendências médicas atuais incluem nanomateriais, especialmente metais nobres, como ouro e prata. Esses materiais têm tido aplicações biomédicas desde a antiguidade (Ge *et al.*, 2014). Pesquisas recentes sobre nanopartículas de ouro foram orientadas para



o tratamento do câncer, enquanto as nanopartículas de prata (AgNPs) foram usadas para combater patógenos (bactérias, fungos, vírus e protozoários) (Ge *et al.*, 2014).

As nanoestruturas de prata cristalina estão disponíveis em muitas formas e tamanhos (Sun *et al.*, 2002) que podem ser usadas como tratamentos médicos (Dankovich *et al.*, 2011; Dubas *et al.*, 2006; Kokura *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2006), mas o efeito das nanopartículas de prata em protozoários parasitas ainda é incompletamente compreendido (Mao *et al.*, 2016). Nesse sentido, dois estudos relataram que o método tradicional para sintetizar as AgNPs pode ter propriedades citotóxicas contra os protozoários patogênicos *Leishmania tropica* e *Toxoplasma gondii* (Allahverdiyev *et al.*, 2011; Adeyemi *et al.*, 2017), embora recentemente Brito *et al.*, 2020, tenham biossintetizado AgNPs a partir de espigas de milho contendo xilanas, foram capazes de causar a morte da cepa Y do *T. cruzi*.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial citotóxico das AgNPs em tripomastigotas de dois biótipos de *T. cruzi in vitro*. Até onde sabemos, esta é a primeira tentativa de definir como a dose e as características estruturais das AgNPs afetam as culturas de *T. cruzi in vitro*, em um esforço para encontrar uma alternativa segura para o tratamento da doença de Chagas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Síntese de nanopartículas de prata

A prata inorgânica (AgNO_3 , $\geq 99,0\%$) e o borohidreto de sódio (NaBH_4 , $\geq 99,99\%$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, EUA. Todas as reações foram realizadas com água deionizada ($18\text{M}\Omega$; Millipore). O método escolhido induz a dispersão de nanopartículas por meio de uma solução coloidal estável, gerando um gradiente de concentração. O borohidreto de sódio foi usado como agente redutor em um banho frio com agitação magnética (Mulfinger *et al.*, 2007). A solução de AgNP (Figura 1) foi produzida usando $0,1\text{ mM AgNO}_3/50\text{ mL (H}_2\text{O)}$.

As AgNPs preparadas em solução aquosa facilitaram o estudo da interação entre as nanopartículas e o parasita, sem a intervenção de qualquer surfactante ou meio de dispersão que não fosse água deionizada. Isso foi obtido após várias sínteses piloto com dois agentes redutores (citrato e borohidreto). O borohidreto produziu uma síntese mais estável e concentrada ($0,1\text{ mM}$ de AgNPs) que serviu para atingir as doses de $1\text{-}12\text{ }\mu\text{g}$ usadas por Allahverdiyev *et al.*, 2011 contra *Leishmania tropica*. A esterilidade das AgNPs foi testada incubando-se as nanopartículas em caldo Luria Bertani estéril ($200\text{ }\mu\text{L}$) a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por duas semanas.



Caracterização estrutural de AgNPs

As nanopartículas foram caracterizadas por espectroscopia UV-Vis, microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) usando uma diluição de 1 % de AgNPs suspensas em água deionizada (v/v). Um Genesys 10S VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) foi usado para realizar a espectroscopia UV-Vis e verificar o comprimento de onda característico da ressonância plasmônica de superfície (400-450 nm) das AgNPs (Mulfinger *et al.*, 2007). Alíquotas (40 μ L) de AgNPs dispersas em metanol (1:5) foram colocadas em 400 grades de cobre revestidas de carbono, secas em um dessecador a 25 °C por 24 h e, em seguida, observadas em um JEM-ARM200F-TEM a 120 kV. Para determinar a direção cristalográfica das facetas das AgNPs por transformada rápida de Fourier (FFT), as distâncias interatômicas foram observadas em um JEM-ARM200F-TEM a 200 kV (HRTEM) e analisadas com o Garantia Microscopy Suite Digital Micrograph Software.

Cultura de parasitas

As formas tripomastigotas das cepas de *T. cruzi* Sylvio X10/4 (Tcl) e Esmeraldo (Tcll) foram cultivadas em monocamadas de células Vero, mantidas em meio DMEM suplementado com 2 % de soro bovino fetal [FBS] e 1 % de penicilina-estreptomicina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) em condições controladas (37 °C, 5 % de CO₂ e umidade saturada) (Aparicio-Burgos *et al.*, 2015). Quando os tripomastigotas começaram a sair das células, os parasitas livres foram coletados e preparados para o ensaio de toxicidade de AgNP.

Os tripomastigotas foram colocados em tubos cônicos de 15 mL e centrifugados a 704 \times g por 7 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets foram ressuspensos em 1 mL de meio DMEM fresco. O número de parasitas foi estimado com um hemocitômetro e ajustado para 1×10^6 por poço em uma placa de cultura de tecidos de 96 poços para o ensaio de toxicidade.

Ensaio de toxicidade de AgNPs para *T. cruzi* *in vitro*

As formas tripomastigotas (1×10^6 por poço) foram colocadas em placas de 96 poços (Sarstedt, EUA) em meio suplementado com DMEM e cultivadas a 37 °C, 5 % de CO₂ e umidade saturada, com diferentes doses de AgNP (1, 5, 10 ou 12 μ g/100 μ L). O ensaio foi realizado em triplicata com tripomastigotas não tratados (- Ctrl) ou tratados com NFMX (400 μ g/100 μ L, Lampit[®], Bayer) como controles negativo e positivo. O NFMX foi preparado conforme descrito por Rolón *et al.*, 2006. Em resumo, um comprimido da



apresentação comercial do NFMX (120 mg) foi triturado em um almofariz e pilão estéreis e ressuspendido em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A concentração final de DMSO no meio de cultura nunca excedeu 0,3 % (v/v).

As placas foram incubadas por 24 horas sob as mesmas condições controladas. Após o tratamento com a droga, a viabilidade do parasita e das células foi estimada pelo MTS (3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximeetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazólio, sal interno) do CellTiter 96 kit[®] Aqueous One Solution (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante, por colorimetria no comprimento de onda de 490 nm. Para esse ensaio, os valores de densidade óptica (DO) se correlacionaram positivamente com a viabilidade celular. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A concentração inibitória meio-máxima (IC₅₀) para cada biótipo de *T. cruzi* foi calculada a partir da curva de dose-resposta (Attarde *et al.*, 2020; Barile & Hopkinson, 1993).

Ensaio citotóxicos *in vitro* em uma linha de células de queratinócitos humanos (HaCaT)

As células HaCaT (uma linha celular imortal de queratinócitos humanos não cancerosos) (2×10⁴/poço) foram cultivadas em uma placa de 96 poços (Sarstedt, EUA) em DMEM suplementado (2% FBS, penicilina 10.000 unidades/mL e estreptomicina 10.000 µg/mL) e AgNPs a 1, 3, 5, 10 ou 12 µg/µL. Para cada experimento, as células de pelo menos três poços foram deixadas sem tratamento (controle). A placa foi incubada por 48 h em condições controladas (37 °C, 5 % de CO₂ e umidade saturada). Após o tratamento, a viabilidade celular foi estimada pelo MTS (3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetiltioxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazólio, sal interno) do CellTiter 96 kit[®] Aqueous One Solution (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A atividade metabólica das células tratadas com MTS foi estimada por colorimetria em um comprimento de onda de 490 nm.

Análises estatísticas

A ANOVA foi usada para analisar os resultados do ensaio de viabilidade *in vitro*. As diferenças médias para todos os ensaios foram avaliadas usando o teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas com P < 0,05. As análises estatísticas foram realizadas com o pacote de software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., EUA).



RESULTADOS

Caracterização de AgNPs

O espectro UV-Vis do coloide de prata aquoso (Figura 1) mostrou um forte pico em 396 nm, uma banda típica de ressonância plasmônica de superfície (SPR) de AgNPs. O pico de absorção estreito e simétrico indica uma distribuição homogênea do tamanho das AgNPs. As micrografias das amostras de AgNPs mostram nanopartículas hemisféricas acompanhadas por algumas estruturas alongadas de tamanho 52 nm (Figura 2a e 2b). A microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) mostrou que ~80 % das partículas eram decaedros (Figura 2c) com facetas {111} (Figura 2d).

Viabilidade celular para o ensaio MTS

As porcentagens de viabilidade tripomastigota para ambas as cepas de *T. cruzi* apresentaram uma resposta dependente da dose; essa resposta foi mais evidente para a cepa Sylvio X10/4, que apresentou uma redução de 50% na viabilidade do parasita na dose de 1 µg de AgNPs e uma redução de 95 % na viabilidade na dose experimental mais alta de 12 µg após 24 horas de tratamento. Entretanto, a cepa Esmeraldo apresentou uma redução de 83% na viabilidade na dose mais alta (12 µg), mostrando diferenças estatísticas entre a cepa Esmeraldo e a cepa Sylvio X10/4. A análise estatística dos resultados mostrou diferenças entre o controle negativo e todos os outros tratamentos, inclusive as diferentes doses de AgNPs e o controle positivo (NFMX) (Figura 3).

Estimativa de IC₅₀

As AgNPs não apresentaram toxicidade diferente entre as IC₅₀ das cepas estudadas de *T. cruzi*. A IC₅₀ para tripomastigotas das cepas Sylvio X10/4 e Esmeraldo foi de 4,05 e 6,16 µg/mL, respectivamente (Figura 4).

Células HaCaT tratadas com AgNPs

A viabilidade das células HaCaT foi avaliada 48 horas após o tratamento (Figura 5). A toxicidade das AgNPs nas células HaCaT foi avaliada pelo MTS em diferentes concentrações: 1, 3, 5, 10 ou 12 µg/100 µL, o que resultou em um IC₅₀ de 10 µg/mL (P<0,05), indicando que as AgNPs eram aproximadamente 2 vezes menos tóxicas para as células HaCaT do que as tripomastigotas. Os resultados mostraram que as AgNPs não foram citotóxicas na dose efetiva (valores de IC₅₀ = 4,05 e 6,16 µg/mL) contra as cepas TcI e TcII do *T. cruzi*.

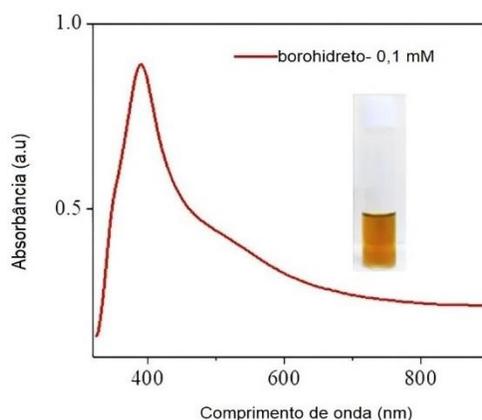


Figura 1. Caracterização de AgNPs por espectroscopia UV-Vis. Espectros de absorvância de AgNPs ($\lambda_{max} = 396$ nm). A figura inserida exibe a fotografia do coloide de nanopartículas de prata

DISCUSSÃO

A doença de Chagas é uma doença transmitida por vetores causada pelo *T. cruzi*, um parasita hemoflagelado que frequentemente causa doenças cardíacas debilitantes e fatais. O BNZ e o NFMX são os únicos medicamentos disponíveis aprovados para tratamento médico (Chaves *et al.*, 2017; Toledo *et al.*, 2004). Entretanto, esses medicamentos induzem efeitos colaterais severos que impedem os pacientes de concluir o tratamento. Em muitos casos, o *T. cruzi* é resistente a esses medicamentos, tornando-os incapazes de eliminar o parasita do tecido infectado (Colantino *et al.*, 2016; Toledo *et al.*, 2004). Portanto, os programas de saúde pública exigem o desenvolvimento de medicamentos terapêuticos mais eficazes e menos tóxicos para o tratamento da doença de Chagas.

As nanopartículas de prata (AgNPs) têm efeitos antimicrobianos não apenas contra fungos (Soliman *et al.*, 2018; Mousavi *et al.*, 2015), bactérias Gram-positivas (Adibhesami *et al.*, 2017) e Gram-negativas (Pal *et al.*, 2007), mas também contra protozoários, como Apicomplexa (*Toxoplasma gondii*) (Adeyemi *et al.*, 2017) e Trypanosomatida (*Leishmania tropica* e *Leishmania infantum*) (Baiocco *et al.*, 2011). Aqui relatamos os efeitos tripanolíticos *in vitro* das AgNPs contra duas cepas diferentes de *T. cruzi*.

Para esse estudo, produzimos AgNPs hemisféricas e decaédricas com um diâmetro médio de 52 nm (Figuras 1 e 2) e as utilizamos em 5 doses diferentes (1, 3, 5, 10 ou 12 $\mu\text{g/mL}$) para testar a toxicidade em células HaCaT e a atividade tripanolítica em tripomastigotas produzidas em cocultura com monocamadas de células Vero. Descobrimos que as nanopartículas de prata reduzem significativamente a viabilidade



celular de forma dependente da dose nas células HaCaT. Essa observação está de acordo com outros estudos (Chen *et al.*, 2019; Perde-Schrepler *et al.*, 2019). É importante ressaltar que as AgNPs não são citotóxicas em doses eficazes contra cepas de *T. cruzi*, e a toxicidade das AgNPs em tripomastigotas foi avaliada indiretamente por um ensaio de proliferação MTS, que mostrou um efeito negativo das AgNPs na viabilidade de tripomastigotas. A Figura 3 mostra que as nanopartículas reduziram significativamente a viabilidade celular em comparação com o controle negativo, e que as AgNPs tinham poder tripanolítico semelhante ao NFMX em diferentes doses. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas na viabilidade do *T. cruzi* com diferentes doses de AgNPs, foi observada uma tendência dependente da dose na viabilidade. Esses dados sugerem que doses mais altas de AgNPs podem ter efeitos adicionais sobre a viabilidade de tripomastigotas de *T. cruzi*. É interessante notar que uma dose relativamente baixa (12 µg/100 µL) de AgNPs matou até 96,3 % (com um IC₅₀ = 4,05 - 6,16 µg/100 µL) de tripomastigotas *in vitro*, enquanto o NFMX (400 µg/100 µL) matou apenas 70 % (Figuras 3 e 4). Isso também sugere que as AgNPs poderiam ser um agente tripanolítico mais eficiente *in vitro* do que o NFMX, conforme observado no presente estudo, mas também em comparação com as nanopartículas de BNZ (com um IC₅₀ = 36 µg/mL) (Scalise *et al.*, 2016).

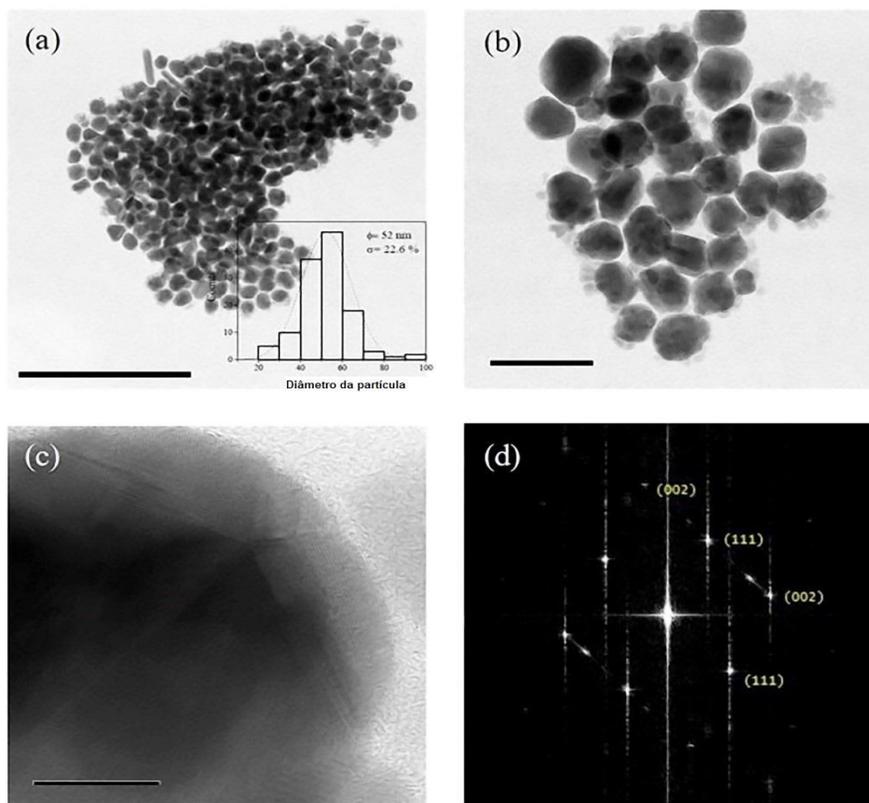


Figura 2. As micrografias mostram nanopartículas de prata produzidas quando o borohidreto foi usado como agente redutor em uma concentração de 0,1 mM. (a) Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) de nanopartículas de prata com diâmetro médio de 52 nm; (b) As partículas são, em sua maioria, semiesféricas, e algumas estruturas alongadas também são observadas; (c) Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (HRTEM) mostrou partículas decaédricas e (d) Transformada Rápida de Fourier (FFT) mostrou facetas {111} e {002}

O *T. cruzi* já desenvolveu alguma resistência ao BNZ e ao NFMX, os únicos medicamentos aprovados clinicamente contra a doença de Chagas (Mejia *et al.*, 2012; Molina *et al.*, 2000). Diferentes biótipos de *T. cruzi* têm resistência diferencial ao BNZ. As cepas TcI do *T. cruzi* são mais resistentes ao BNZ, enquanto as cepas TcII são mais sensíveis a esse medicamento (Toledo *et al.*, 2004; Mejia *et al.*, 2012). Aqui, não encontramos diferenças na sensibilidade às AgNPs entre as duas cepas de *T. cruzi* testadas (Sylvio X10/4 e Esmeraldo) pertencentes a diferentes biótipos (TcI e TcII, respectivamente). Embora sejam necessários mais estudos, nossos dados referentes ao amplo espectro de atividade antiparasitária das AgNPs sugerem que as nanopartículas podem ser uma opção interessante para resolver o problema da resistência do parasita a outros medicamentos, seja como medicamento alternativo ou em combinação com os medicamentos atualmente em uso.

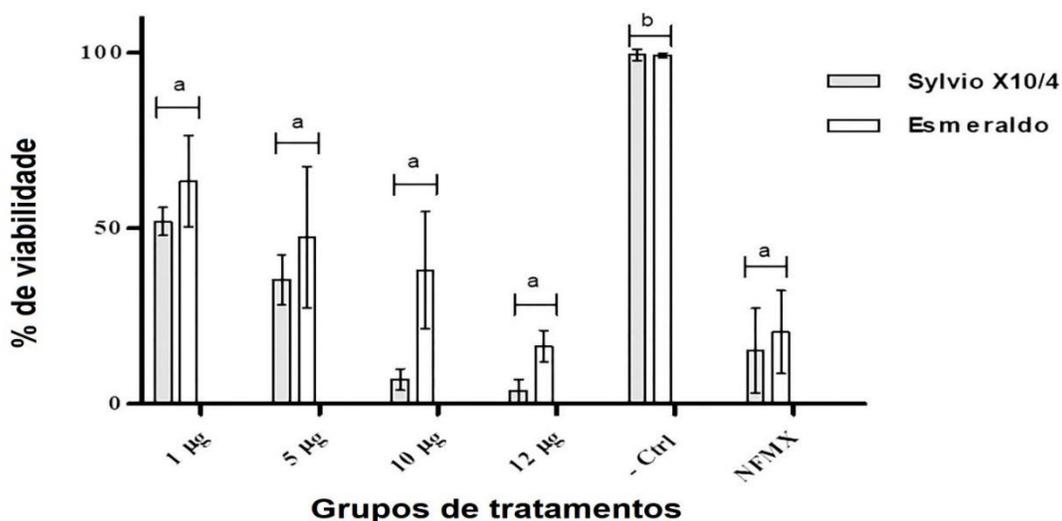


Figura 3. Sobrevivência do *T. cruzi* após o tratamento com qualquer uma das três doses diferentes de AgNPs (1, 5, 10, 12 µg/100 µl), Nifurtimox (NFMX, 400 µg/100 µl) ou sem tratamento (-Ctrl, usado como controle negativo para o ensaio de viabilidade MTS). As amostras foram avaliadas após 24 horas de tratamento. Cada barra representa o valor médio da absorbância ± SD. As diferenças ($P < 0,05$) entre os grupos, de acordo com o teste de Tukey, são indicadas por caracteres na parte superior das barras de tratamento

Estudos adicionais devem abordar os efeitos das AgNPs como drogas alternativas contra o *T. cruzi*, especialmente para entender se essas nanopartículas podem exercer um efeito prejudicial sobre as formas amastigotas, o estágio de desenvolvimento intracelular do parasita em mamíferos. Foi relatado que os amastigotas de *Leishmania tropica* são mais sensíveis às AgNPs do que os promastigotas em uma dose de 10 µg/0,1 mL (Allahverdiyev *et al.*, 2011). Se essa hipótese for válida para o *T. cruzi*, o uso de AgNPs *in vivo* para uso terapêutico contra a doença de Chagas se tornaria um tópico interessante de estudo.

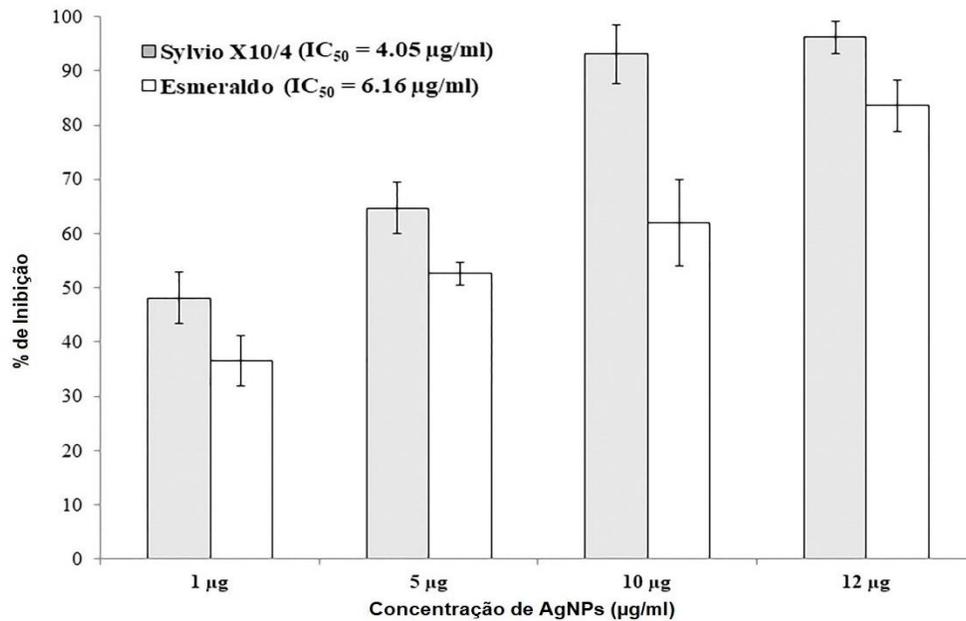


Figura 4. Inibições de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento com AgNPs (1, 5, 10, 12 µg/100 µl). Cada barra representa o valor médio da absorbância ± desvio padrão (n=6). Dentro do mesmo ponto de tempo, as diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos são mostradas com caracteres diferentes acima das barras, de acordo com o teste de Tukey

MTT at 48 HaCaT

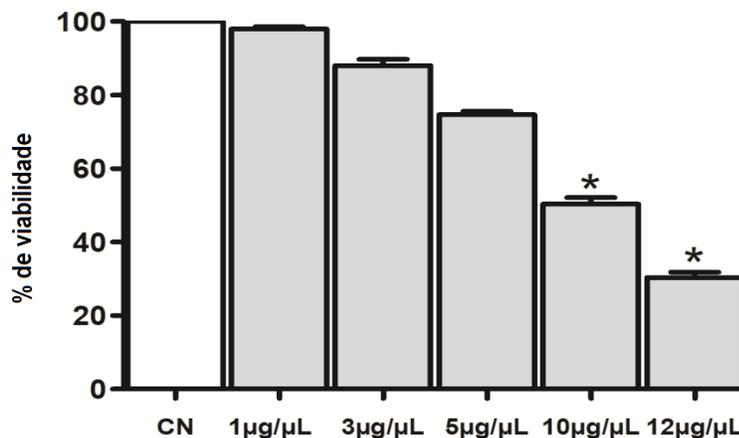


Figura 5. A viabilidade das células HaCaT foi examinada pelo ensaio MTS. As células HaCaT foram estimuladas com várias doses de AgNPs (1, 3, 5, 10, 12 µg/100 µl) por 24 horas. Os asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas em comparação com o controle (CN) ($P < 0,05$)



As AgNPs possuem propriedades físicas e eletrônicas exclusivas, o que as torna excelentes candidatas para aplicações médicas. O mecanismo antimicrobiano das AgNPs parece estar relacionado à formação de radicais livres que danificam a membrana dos microrganismos (Kim *et al.*, 2007). Essas propriedades dependem do tamanho, da forma e do revestimento das nanopartículas (Dubey *et al.*, 2015). No presente estudo, sintetizamos AgNPs com um diâmetro médio de 52 nm; a maioria delas era hemisférica (decaédrica), tinha facetas {111} e {110} e apresentava atividade tripanolítica aceitável. Entretanto, acreditamos que a atividade tripanolítica das AgNPs poderia ser melhorada se a forma e o tamanho das nanopartículas fossem ajustados para triângulos com tamanho de 1 a 10 nm. Esse tipo de nanopartículas apresenta maior atividade antibacteriana do que as AgNPs maiores com formatos hemisféricos devido à maior densidade nas facetas {111}. Isso permite que as nanopartículas triangulares permeiem livremente a membrana plasmática e, assim, induzam mais danos aos microrganismos. Além disso, as AgNPs triangulares truncadas exigem doses menores (1-10 µg/0,1 µL) para exercer propriedades bactericidas do que as AgNPs esféricas e nanorodais maiores (12,5 e 50-100 µg/0,1 µL, respectivamente) (Ge *et al.*, 2014; Dubey *et al.*, 2015; Morones *et al.*, 2005).

CONCLUSÕES

Uma dose de 12 µg/100 µL de AgNPs com um diâmetro médio de 52 nm foi citotóxica para tripomastigotas dos biótipos TcI e TcII do *T. cruzi in vitro*. Estudos futuros testarão AgNPs de formato triangular com facetas {111} para melhorar os efeitos antiprotozoários das AgNPs em diferentes biótipos de *T. cruzi*.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Agradecimentos. Este trabalho foi apoiado pelos seguintes subsídios: UAEH-PTC-714, DSA/103.5/15/10450; UAEH-PTC-673, DSA/103.5/15/7001 e Projeto para a integração de redes temáticas de colaboração acadêmica 2015 "Nanotecnologia como ferramenta para o diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas" do órgão acadêmico UAEM-CA-2015 do Ministério da Educação Pública, México.



LITERATURA CITADA

ADEYEMI OS, Murata Y, Sugi T, Kato K. 2017. Inorganic nanoparticles kill *Toxoplasma gondii* via changes in redox status and mitochondrial membrane potential. *International Journal of Nanomedicine*. 12: 1647–1661. ISSN: 1176-9114.

<https://doi.org/10.2147/IJN.S122178>

ADIBHESAMI M, Ahmadi M, Farshid AA, Sarrafzadeh-Rezaei F, Dalir-Naghadeh B. 2017. Effects of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* contaminated open wounds healing in mice: An experimental study. *Veterinary Research Forum*. 8(1): 23-28. ISSN: 2008-8140. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5413307/>

ALLAHVERDIYEV AM, Abamor ES, Bagirova M, Ustundag CB, Kaya C, Kaya F, Rafailovich M. 2011. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. *International Journal of Nanomedicine*. 6:2705. ISSN: 1176-9114. <https://doi.org/10.2147/IJN.S23883>

APARICIO-BURGOS JE, Zepeda-Escobar, JA, de Oca-Jimenez, RM, Estrada-Franco, JG, Barbabosa-Pliego, A, Ochoa-García, L, Alejandro-Aguilar R, Rivas N, Peñuelas-Rivas, G, Val-Arreola M, Shivali Gupta, Salazar-García F, Garg NJ, Vázquez-Chagoyán JC. 2015. Immune protection against *Trypanosoma cruzi* induced by TcVac4 in a canine model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 9(4): e0003625. ISSN: 1935-2735. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003625>

ATTARDE SS, Pandit, SV. 2020. Anticancer potential of nanogold conjugated toxin GNP-NN-32 from *Naja naja* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 26. ISSN: 1678-9199. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0047>

BAIOCCO P, Ilari, A, Ceci, P, Orsini, S, Gramiccia, M, Muccio TD, Colotti G. 2011. Inhibitory effect of silver nanoparticles on trypanothione reductase activity and *Leishmania infantum* proliferation. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2(3): 230-233. ISSN: 1948-5875. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ml1002629>

BARILE FA, Arjun, S, Hopkinson, D. 1993. *In vitro* cytotoxicity testing: biological and statistical significance. *Toxicology In Vitro*. 7(2):111-116. ISSN: 0887-2333. [https://doi.org/10.1016/0887-2333\(93\)90120-T](https://doi.org/10.1016/0887-2333(93)90120-T)

BRITO TK, Viana, RLS, Moreno, CJG, da Silva Barbosa, J, de Sousa, JFL, de Medeiros, MJC, Rocha, HAO. 2020. Synthesis of silver nanoparticle employing corn cob xylan as a reducing agent with anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *International Journal of Nanomedicine*. 15: 965-979. ISSN: 1176-9114. <https://doi.org/10.2147/IJN.S216386>



CHAVES GC, Arrieche MAS, Rode J, Mechali D, Reis, PO, Stobbaerts, A, Girón AE, Nora, RI. 2017. Estimating demand for anti-Chagas drugs: a contribution for access in Latin America/Estimacion de la demanda de medicamentos antichagasicos: una contribucion para el acceso en America Latina/Estimativa da demanda de medicamentos antichagasicos: uma contribuicao para o acesso na America Latina. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 41(8):1-8. ISSN: 1680 5348. <https://www.scielosp.org/pdf/rpsp/2017.v41/e45/es>

CHEN L, Wu, M, Jiang, S, Zhang, Y, Li, R, Yongbo L, Lin L, Gang W, Ying L, Liming X, Liming X. 2019. Skin toxicity assessment of silver nanoparticles in a 3D epidermal model compared to 2D keratinocytes. *International Journal of Nanomedicine*. 14:9707-9719. ISSN: 1176-9114. <https://doi.org/10.2147/IJN.S225451>

COLANTONIO LD, Prado N, Segura EL, Sosa ES. 2016. Electrocardiographic abnormalities and treatment with benznidazole among children with chronic infection by *Trypanosoma cruzi*: a retrospective cohort study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 10(5): e0004651. ISSN: 1935-2735. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004651>

DANKOVICH TA, Gray DG. 2011. Bactericidal paper impregnated with silver nanoparticles for point-of-use water treatment. *Environmental Science & Technology*. 45(5): 1992-1998. ISSN: 1520-5851. <https://doi.org/10.1021/es103302t>

DUBAS ST, Kumlangdudsana P, Potiyaraj P. 2006. Layer-by-layer deposition of antimicrobial silver nanoparticles on textile fibers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 289(1-3): 105-109. ISSN: 0927-7757. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.04.012>

DUBEY P, Matai, I, Kumar, SU, Sachdev, A, Bhushan, B, Gopinath P. 2015. Perturbation of cellular mechanistic system by silver nanoparticle toxicity: Cytotoxic, genotoxic and epigenetic potentials. *Advances in Colloid and Interface Science*. 221: 4-21. ISSN: 0001-8686. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.02.007>

EL-SAYED NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger GS, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 309(5733): 409-415. ISSN: 00368075. <https://doi.org/10.1126/science.1112631>

GE L, Li Q, Wang M, Ouyang J, Li X, Xing MMQ. 2014. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *International Journal of Nanomedicine*. 9: 2399-2407. ISSN: 1176-9114. <https://doi.org/10.2147/IJN.S55015>



IBÁÑEZ-CERVANTES G, León-García G, Castro-Escarpulli G, Mancilla-Ramírez J, Victoria-Acosta G, Cureño-Díaz MA, Sosa-Hernández O, Bello-López JM. 2018. Evolution of incidence and geographical distribution of Chagas disease in Mexico during a decade (2007–2016). *Epidemiology & Infection*. 147:1-7. ISSN: 1469-4409. <https://doi.org/10.1017/S0950268818002984>

JAMES TN, Rossi MA, Yamamoto S. 2005. Postmortem studies of the intertruncal plexus and cardiac conduction system from patients with Chagas disease who died suddenly. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 47(4): 258-275. ISSN: 0033-0620. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2005.01.003>

KIM JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwang CY, Kim YK, Lee YS, Jeong DH, Cho MH. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 3(1): 95-101. ISSN: 1549-9634. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>

KOKURA S, Handa O, Takagi T, Ishikawa T, Naito Y, Yoshikawa, T. 2010. Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 6(4): 570-574. ISSN: 1549-9634. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.12.002>

LEE KS, El-Sayed MA. 2006. Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition. *Journal of Physical Chemistry B*. 110(39): 19220-19225. ISSN: 1520-5207. <https://doi.org/10.1021/jp062536y>

MAO BH, Tsai JC, Chen CW, Yan SJ, Wang YJ. 2016. Mechanisms of silver nanoparticle-induced toxicity and important role of autophagy. *Nanotoxicology*. 10(8): 1021-1040. ISSN: 1743-5404. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1189614>

MEJIA AM, Hall BS, Taylor MC, Gómez-Palacio A, Wilkinson SR, Triana-Chávez O, Kelly JM. 2012. Benzimidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *The Journal of Infectious Diseases*. 206(2): 220-228. ISSN: 1537-6613. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis331>

MOLINA J, Martins-Filho, O, Brener, Z, Romanha, AJ, Loebenberg, D, Urbina, JA. 2000. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44(1): 150-155. ISSN: 1098-6596.

<https://doi.org/10.1128/AAC.44.1.150-155.2000>

MORONES JR, Elechiguerra, JL, Camacho, A, Holt, K, Kouri, JB, Ramírez, JT, Yacaman, JM. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 16(10): 2346. ISSN: 09574484. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>



MOUSAVI SAA, Salari, S, Hadizadeh, S. 2015. Evaluation of antifungal effect of silver nanoparticles against *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporium gypseum*. *Iran Journal of Biotechnology*. 13(4): 38-42. ISSN: 1728-3043. <https://doi.org/10.15171/ijb.1302>

MULFINGER L, Solomon, SD, Bahadory, M, Jeyarajasingam, AV, Rutkowsky, SA, Boritz, C. 2007. Synthesis and study of silver nanoparticles. *Journal of Chemical Education*. 84(2): 322. ISSN: 00219584. <https://doi.org/10.1021/ed084p322>

PAL S, Tak, YK, Song, JM. 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(6):1712-1720. ISSN: 1098-5336. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>

PERDE-SCHREPLER M, Florea A, Brie I, Virag P, Fischer-Fodor E, Vâlcan A, Gurzău E, Lisencu C, Maniu A. 2019. Size-dependent cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in cochlear cells *in vitro*. *Journal of Nanomaterials*. e6090259. ISSN: 1687-4129. <https://doi.org/10.1155/2019/6090259>

ROLÓN M, Vega C, Escario JA, Gómez BA. 2006. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research*. 99(2): 103-107. ISSN: 1432-1955. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0126-y>

SCALISE ML, Arrúa EC, Rial MS, Esteva MI, Salomon CJ, Fichera LE. 2016. Promising efficacy of benzimidazole nanoparticles in acute *Trypanosoma cruzi* murine model: in-vitro and in-vivo studies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 95(2): 388-393. ISSN: 0002-9637. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0889>

SOLIMAN H, Elsayed A, Dyaa A. 2018. Antimicrobial activity of silver nanoparticles biosynthesised by *Rhodotorula* sp. strain ATL72. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5(3): 228-233. ISSN: 2314-808X. <https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2018.05.005>

SUN Y, Xia Y. 2002. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science*. 298(5601): 2176-2179. ISSN: 00368075. <https://doi.org/10.1126/science.1077229>

TOLEDO MJO, Bahia MT, Veloso VM, Carneiro CM, Machado-Coelho GLL, Alves CF, Martins HR, Cruz RE, Tafuri WL, Lana M. 2004. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53(6):1045-1053. ISSN: 03057453. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh224>

[Errata Erratum](#)

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/errata>