

Toxicidad *in vitro* del óxido de grafeno reducido en el sistema hepato-gastrointestinal: revisión bibliográfica

Cebadero-Domínguez, O¹, Jos, A^{1*}, Cameán, A.M¹.

¹Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España

Resumen: Recientemente, el interés por el óxido de grafeno reducido (OGr) se ha visto incrementado debido a sus numerosas propiedades. Considerando que el uso de estos materiales ha aumentado en los últimos años, esto puede suponer un mayor riesgo para la salud humana. La vía oral es una de las principales rutas de exposición, por lo que es importante determinar cuáles son los principales efectos tóxicos sobre el sistema hepato-gastrointestinal. En este sentido, el objetivo de este estudio es revisar los posibles efectos tóxicos *in vitro* del OGr en las principales líneas celulares de los sistemas intestinal y hepático. Los resultados muestran que el OGr podría ser tóxico en modelos *in vitro*; sin embargo, son necesarios un mayor número de investigaciones para determinar los posibles mecanismos de toxicidad.

Palabras clave: óxido de grafeno reducido; *in vitro*; tracto gastrointestinal; hígado.

Abstract: *In vitro* toxicity of reduced graphene oxide in the hepato-gastrointestinal system: a review

Recently, the interest in reduced graphene oxide (rGO) has increased due to its myriad of properties. Considering the higher use of this material in the last years, it is important to evaluate its potential risk on human health. The oral pathway is one of the main exposure routes, therefore, it is important to assess its toxic effects on the hepato-gastrointestinal system. In this sense, the aim of this study is to review the potential *in vitro* toxic effects of rGO on gastrointestinal and liver cell lines. The results obtained showed that rGO could be toxic in *in vitro* models; however, further toxicological studies are required to define its mechanisms of toxicity.

Keywords: reduced graphene oxide; *in vitro*; gastrointestinal tract; liver.

Introducción

El grafeno es una lámina de un átomo de espesor formada por átomos de carbono organizados en una estructura similar al de un panal de abeja (Geim y Novoselov, 2007). El óxido de grafeno (OG), el óxido de grafeno reducido (OGr), los quantum dots de grafeno (GQDs) o las nanoplaquetas de grafeno (GNPs) son algunas de las formas más comunes (Tiwari et al., 2020). Estos materiales poseen propiedades únicas, como su buena conductividad eléctrica y térmica (Suk et al., 2013; Balandin, 2011), su fuerza mecánica y gran elasticidad (Lee et al., 2008) o fácil funcionalización con otros materiales (Loh et al., 2008). Todo esto hace que el interés por estos materiales se haya visto incrementado en los últimos años, así como su uso en diferentes áreas de la electrónica, ingeniería textil, biotecnología o la biomedicina, destacando terapias anticancerígenas o como nanotransportador de medicamentos (Singh, 2016; Jiang et al., 2017; Dhanavel et al., 2020; Dhinakaran et al., 2020). Además, algunos estudios han puesto de manifiesto el potencial uso de estos materiales en la industria del envasado de alimentos (Goh et al., 2016; Barra et al., 2020).

Entre los derivados del grafeno, el OG y el OGr son los más ampliamente utilizados. El OG se sintetiza a partir de la oxidación del grafito (Paulchamy et al., 2015). El OG puede someterse a una reducción química, térmica o de otro tipo, para obtener OGr (Zainuddin et al., 2018).

Con el rápido incremento en el uso y la producción de estos materiales, es necesario que se evalúe su riesgo para la salud y sus posibles efectos tóxicos en humanos. En este sentido, en 2021 la Autoridad Europea en

Seguridad Alimentaria (EFSA) publicó una guía cuyo objetivo es orientar sobre la evaluación de riesgos de la aplicación de nanomateriales en alimentos y en la cadena alimentaria (EFSA, 2021).

Son varios los estudios que han revisado los posibles efectos tóxicos de los derivados del grafeno, tanto *in vitro*, como *in vivo* (Liao et al., 2018; Achawi et al., 2021; Wu et al., 2021; Cebadero-Domínguez et al., 2022a *en prensa*). Sin embargo, la información sobre el OGr aún es limitada. Diversos estudios han determinado sus posibles efectos tóxicos en líneas celulares pulmonares (Mittal et al., 2016; Bengston et al., 2017; Liao et al., 2018), al ser la vía inhalatoria una ruta de exposición frecuente para nanomateriales. Sin embargo, teniendo en cuenta que la vía oral es otra de las principales rutas de exposición, es importante determinar cuál es el posible efecto del grafeno sobre el tracto gastrointestinal (g.i). Además, Cebadero-Domínguez et al., (2022a *en prensa*) concluyen que los materiales de grafeno pueden ser absorbidos y distribuidos a lo largo del organismo, provocando no solo daño local, sino sistémico.

Por lo tanto, el objetivo de esta revisión es esclarecer los posibles efectos tóxicos del OGr *in vitro* sobre líneas celulares de origen humano representativas de los sistemas g.i y hepático.

Material y métodos

Se han realizado búsquedas en la bibliografía científica utilizando las bases de datos Science Direct y Pubmed y como palabras clave, reduced Graphene Oxide, *in vitro*, intestinal y liver. No se estableció ninguna limitación temporal. Tras la lectura de los resúmenes y la confirmación de la idoneidad y pertinencia de los estudios para los objetivos previstos, se seleccionaron un total de 7 artículos.

Resultados

El número de artículos en relación a la toxicidad *in vitro* del OGr en líneas celulares de intestino e hígado es limitado. Sin embargo, resulta pertinente llevar a cabo su evaluación toxicológica ya que los estudios disponibles indican que los materiales de grafeno son resistentes a las condiciones del tracto g.i (Cebadero-Domínguez et al., 2022a *en prensa*) y por tanto son susceptibles de producir toxicidad.

Sistema intestinal

Respecto al sistema intestinal, los modelos *in vitro* son ampliamente utilizados para estudios de ingeniería de tejidos, ensayos farmacológicos y/o toxicológicos etc., ya que permiten el estudio de los complejos fenómenos *in vivo* en un contexto simplificado, que permite un control adecuado y la repetitividad de la evaluación de la respuesta celular (Costa y Ahluwalia; 2019).

Existen varias líneas celulares epiteliales derivadas de cáncer colorectal utilizadas para este tipo de ensayos. Estas líneas proliferan fácilmente, lo que las hace muy útiles para ensayos de toxicología (Creff et al., 2020). La línea celular de adenocarcinoma de colon, Caco-2, forma monocapas similares a las del intestino delgado (Noben et al., 2017). Otra línea celular utilizada como modelo intestinal es la HT-29. Al igual que las Caco-2, provienen de células de adenocarcinoma de colon, sin embargo, la principal característica que las diferencia es que, bajo ciertas condiciones de cultivo, tienen la capacidad de producir moco. Este moco imita la capa protectora del intestino (Ponce de León-Rodríguez et al., 2018). Otros modelos también incluyen las líneas celulares T84 y SW480 (Creff et al., 2020).

Sin embargo, la complejidad del sistema g.i. hace que los modelos de monocultivos no sean totalmente fieles a la realidad. Por este motivo,

*e-mail: angelesjos@us.es

se diseñó un modelo experimental de cocultivo de Caco-2 y HT29. Este cocultivo imita las condiciones del intestino y mejora los resultados experimentales (Costa y Ahluwalia; 2019).

Respecto al OGr, son escasos los estudios que podemos encontrar en modelos intestinales *in vitro*. Solo dos estudios determinaron la posible toxicidad del OGr en la línea celular Caco-2 (Garriga et al., 2020; Cebadero-Domínguez et al., 2021, Cebadero-Domínguez et al., 2022b *en prensa*). Garriga et al. (2020) utilizaron el ensayo de la reducción de la sal de tetrazolium MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazol) para determinar la viabilidad celular. Se observó una disminución significativa de la viabilidad en células expuestas a 3 µg/mL de OGr después de 72h. Cebadero-Domínguez et al. (2020b *en prensa*) determinaron el mismo parámetro mediante el ensayo de reducción de la sal de tetrazolium MTS (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazolio). Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de OGr (0-250 µg/mL). La viabilidad celular disminuyó significativamente a partir de 125 µg/mL de OGr tras 24h y 48h de exposición. La concentración efectiva media (CE₅₀) calculada fue de 176.3 ± 7.6 µg/mL tras 24 horas y 166.5 ± 21.9 µg/mL tras 48 h de exposición.

Ambos estudios también midieron la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Los niveles de ERO incrementaron con la exposición a 3 µg/mL después de 24 h de exposición (Garriga et al., 2020). De forma similar, tras 4, 8, 12 y 24 h de exposición a diferentes concentraciones (CE₅₀, CE₅₀/2 y CE₅₀/4) los niveles de ERO también aumentaron (Cebadero-Domínguez et al., 2022b *en prensa*). Además, estos mismos autores observaron la internalización del OGr en células Caco-2. Estos estudios mostraron que el OGr es más citotóxico que su homólogo no reducido.

Respecto a otras líneas celulares intestinales, Abdolahad et al., (2013), no observaron citotoxicidad en células HT29 y SW48 expuestas a OG reducido con té verde (3 mg/L) con el ensayo MTT, ni tampoco una mayor apoptosis medida por citometría de flujo en comparación con el grupo control. Por otro lado, sí que disminuyó la viabilidad cuando estas células fueron expuestas a OGr e irradiadas con un láser infrarrojo, sugiriendo la utilización del OGr para la fotodestrucción de células tumorales.

Sistema hepático

Los tóxicos ingeridos oralmente son metabolizados primero en el sistema g.i. (Niu et al., 2014). Además, estos tóxicos pueden ser absorbidos y pasar al sistema hepático, pudiendo provocar hepatotoxicidad (Roberts et al., 2002).

Para estudiar esta hepatotoxicidad, alguno de los modelos *in vitro* más utilizados se basan en líneas celulares inmortalizadas hepáticas, incluyendo las líneas celulares Fa2N-4, HepG2, C3A, Huh7, o HepaRG. Dentro de éstas, la línea celular HepG2 es la más ampliamente utilizada (LeCluyse et al., 2012). Además, existe una línea celular derivada de un hepatocarcinoma (HepaRG), capaz de diferenciarse *in vitro* en células similares a hepatocitos maduros. Esto permite que estas células sean un modelo ideal para reproducir estudios sobre los efectos agudos y crónicos de los tóxicos en células hepáticas (Anthérieu et al., 2012).

Respecto a los estudios de OGr en sistemas hepáticos, la mayoría de la bibliografía emplea HepG2 como modelo celular *in vitro*. Todos los resultados obtenidos muestran una disminución de la viabilidad en células expuestas a OGr (Chatterjee et al., 2014; Lingaraju et al., 2019; Ahamed et al., 2020a; 2020b; Zuchowska et al., 2020). Chatterjee et al., (2014) reportaron que la CE₅₀ fue 46 mg/L después de 24 h de exposición, sin embargo, la CE₅₀ para Lingaraju et al., (2019) fue de 357.53 µg/mL para OG reducido mediante hojas de *Euphorbia heterophylla*. Ahamed et al., (2020a) observaron una disminución significativa de la viabilidad de HepG2 expuestas a OGr a partir de 50 µg/mL durante 24h. Todos los estudios utilizaron ensayos basados en la reducción de MTT. Estos resultados de citotoxicidad fueron

confirmados por el método de tinción diferencial, que indicó que el OGr a una concentración de 800 µg/mL incrementó la cantidad de células HepG2 muertas (Zuchowska et al., 2020).

En relación con la citotoxicidad, también se ha investigado la posible respuesta apoptótica en HepG2. Chatterjee et al, (2014) determinaron apoptosis mediante citometría de flujo en HepG2 expuestas a diferentes concentraciones de OGr (5-50 µg/mL) durante 24h. Ahamed et al., (2020a) determinaron la respuesta apoptótica en HepG2 expuestas a 100 µg/mL durante 24 h mediante diferentes marcadores apoptóticos: disminución del potencial de membrana mitocondrial, aumento de la actividad de la enzima caspasa-3 y determinación de las diferentes fases del ciclo celular mediante citometría de flujo. Tanto Chatterjee et al. (2014) como Ahmed et al., (2020a), indicaron que la exposición a OGr induce apoptosis en este modelo experimental.

Además, algunos estudios han investigado la posible generación de estrés oxidativo en HepG2 (Chatterjee et al., 2014; Ahamed et al., 2020a; 2020b). Todos los estudios indicaron un incremento de ERO después de la exposición a OGr. Chatterjee et al., (2014) observaron que el incremento de ERO fue un fenómeno temprano ya que aumentó a 4h y no a 24h, en contraposición a Ahmed et al., (2020a; 2020b), que observaron el incremento de ERO a 24h a una concentración de 100 µg/mL. Además, todos los autores anteriores analizaron los niveles de glutatión (GSH) intracelular, como marcador de estrés oxidativo, observando una disminución del mismo.

Por otro lado, sólo un estudio indicó que el OGr (CE₅₀ y CE₂₀) no era internalizado por células HepG2 (Chatterjee et al., 2014), aunque sí produjo citotoxicidad y estrés oxidativo, como se ha indicado anteriormente. Ahmed et al., (2020b) estudiaron el efecto combinado del OGr y el Cd y observaron que concentraciones no citotóxicas de OGr mitigaban la toxicidad del Cd, lo que podía ser debido a su adsorción superficial.

Solamente un estudio evaluó el efecto genotóxico del OGr (Chatterjee et al., 2014). Para ello, se llevó a cabo el ensayo cometa, un ensayo ampliamente utilizado para detectar roturas en la hebra de ADN (Collins et al., 2008). Además, el daño en la doble cadena del ADN fue medido a través de la activación de la fosforilación de la histona γ-H2AX (Nelson et al., 2017). En ambos casos, el resultado fue positivo, indicando que el OGr es genotóxico en la línea celular HepG2.

Solamente un estudio investigó la posible toxicidad en una línea hepática diferente de HepG2. Zuchowska et al., (2020) utilizaron la línea celular no cancerígena Clone9. Los resultados mostraron que la exposición a OGr produce citotoxicidad dependiente de la concentración y el tiempo de exposición en Clone9. La viabilidad se redujo a un 57.87% con respecto al control. En comparación con las HepG2, los efectos citotóxicos del OGr fueron más leves en Clone9.

Conclusión

Este trabajo revisa los principales efectos tóxicos *in vitro* que el OGr puede provocar tanto en el sistema g.i. como hepático, órganos diana tras una potencial exposición oral. Todos los estudios indican que el OGr puede ser tóxico en líneas celulares intestinales y hepáticas. Sin embargo, la información es aún muy limitada, por lo que son necesarios más estudios toxicológicos que profundicen en los mecanismos de acción asociados.

Agradecimientos

Agradecimientos: Proyecto US-1259106 cofinanciado por el Programa Operativo FEDER 2014-2020 y la Consejería de Economía, Conocimiento, Empresas y Universidad de la Junta de Andalucía. Y el proyecto P18-RT-1993 (PAIDI-2020, Junta de Andalucía).

Bibliografía

1. Abdolahad M, Janmaleki M, Mohajerzadeh S, Akhavan O, Abbasi S. Polyphenols attached graphene nanosheets for high efficiency NIR mediated photodestruction of cancer cells. Mater Sci Eng C

- Mater Biol. 2013 1;33(3):1498-505.
2. *Ahamed M, Akhtar MJ, Khan MAM.* Investigation of Cytotoxicity, Apoptosis, and Oxidative Stress Response of Fe₃O₄-RGO Nanocomposites in Human Liver HepG2 cells. *Materials*. 2020a ;13(3):660.
 3. *Ahamed, M., Akhtar, M. J., Khan, M., & Alhadlaq, H. A.* Reduced graphene oxide mitigates cadmium-induced cytotoxicity and oxidative stress in HepG2 cells. *Food Chem. Toxicol.* 2020b. 143, 111515.
 4. *Anthérieu, S., Chesné, C., Li, R., Guguen-Guillouzo, C., & Guillouzo, A.* Optimization of the HepaRG cell model for drug metabolism and toxicity studies. *Toxicol In Vitro.* 2012 26(8), 1278–1285.
 5. *Balandin AA.* Thermal properties of graphene and nanostructured carbon materials. *Nat Mater.* 2011;10(8):569-581.
 6. *Barra A, Santos JDC, Silva MRF, et al.* Graphene Derivatives in Biopolymer-Based Composites for Food Packaging Applications. *Nanomater* . 2020;10(10):2077.
 7. *Cebadero-Domínguez, O, Moreno Onorato, J, Cameán Fernández, A.M, Jos Gallego, A.* Internalización del óxido de grafeno reducido en células caco-2 e inducción de estrés oxidativo. 2021. *Rev. Toxicol.* 38 (1): 54-55.
 8. *Cebadero-Domínguez, O, Jos, A, Cameán, A.M, Cătuțescu, G. M.* Hazard characterization of graphene nanomaterials in the frame of their food risk assessment: a review *Food Chem. Toxicol.* 2022a (*en prensa*)
 9. *Cebadero-Domínguez, O, Ferrández-Gómez, B, Sánchez-Ballester, S, Moreno, J, Jos, A, Cameán A.M.* *In vitro* toxicity evaluation of graphene oxide and reduced graphene oxide on Caco-2 cells. *Toxicol. Rep.* 2022b (*en prensa*).
 10. *Chatterjee N, Eom HJ, Choi J.* A systems toxicology approach to the surface functionality control of graphene-cell interactions. *Biomaterials.* 2014;35(4):1109-1127.
 11. *Collins, A.R., Azqueta, A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C., Stetina, R.* The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 2008. 23 (3), 143–151.
 12. *Costa J, Ahluwalia A.* Advances and Current Challenges in Intestinal *in vitro* Model Engineering: A Digest. *Bioeng Biotechnol.* 2019; 7:144.
 13. *Creff J, Malaquin L, Besson A.* *In vitro* models of intestinal epithelium: Toward bioengineered systems. *J Tissue Eng.* 2021; 12:2041731420985202.
 14. *Dhanavel, S., Revathy, T.A., Sivaranjani, T. et al.* 5-Fluorouracil and curcumin co-encapsulated chitosan/reduced graphene oxide nanocomposites against human colon cancer cell lines. *Polym. Bull.* 2020.77,213–233
 15. *Dhinakaran, V., Lavanya, M., Vigneswari, K., Ravichandran, M., & Vijayakumar, M. D.* Review on exploration of graphene in diverse applications and its future horizon. *Materials.* 2020 27, 824–828.
 16. *EFSA Scientific Committee, More S, Bampidis V, Benford D, Bragard C, Halldorsson T, HernándezJerez A, Hougaard Bennekou S, Koutsoumanis K, Lambré C, Machera K, Naegeli H, Nielsen S, Schlatter J, Schrenk D, Silano V, Turck D, Younes M, Castenmiller J, Chaudhry Q, Cubadda F, Franz R, Gott D, Mast J, Mortensen A, Oomen AG, Weigel S, Barthelemy E, Rincon A, Tarazona J and Schoonjans R* 2021. Guidance on risk assessment of nanomaterials to be applied in the food and feed chain: human and animal health. *EFSA Journal* 2021;19(8):6768, 111.
 17. *Garriga R, Herrero-Continente T, Palos M, Cebolla VL, Osada J, Muñoz E, Rodríguez-Yoldi MJ.* Toxicity of Carbon Nanomaterials and Their Potential Application as Drug Delivery Systems: *In Vitro* Studies in Caco-2 and MCF-7 Cell Lines. *Nanomaterials.* 2020; 10(8):1617.
 18. *Geim. A.K., Novoselov, K. S.* The rise of graphene. *Nat. Mater.* 2007, 1–265
 19. *Goh K, Heising JK, Yuan Y, et al.* Sandwich-Architected Poly(lactic acid)-Graphene Composite Food Packaging Films. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(15):9994-10004.
 20. *Jiang, W. J., Mo, F., Jin, X., Chen, L., Xu, L. J., Guo, L. Q., Fu, F.-F., Adv. Mater. Interfaces* 2017, 4, 1700425.
 21. *Lingaraju, Kaushik & Naika H, Raja Naika & Ganganagappa, Nagaraju & Bhushana, Naga.* Biocompatible synthesis of reduced graphene oxide from *Euphorbia heterophylla* (L.) and their *in-vitro* cytotoxicity against human cancer cell lines. *Biotechnol.* 2019. 24.
 22. *LeCluyse, E. L.; Witek, R. P.; Andersen, M. E.; Powers, M. J.* Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing. *Crit. Rev. Toxicol.* 2012, 42 (6), 501–548
 23. *Lee C, Wei XD, Kysar JW, Hone J.* Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. *Science.* 2008; 321(5887):385–388.
 24. *Loh KP, Bao QL, Ang PK, Yang JX.* The chemistry of graphene. *J Mater Chem.* 2010;20(12):2277–2289.
 25. *Niu, X.; de Graaf, I. A. M.; van der Bij, H. A.; Groothuis, G. M. M.* Precision-cut intestinal slices as an ex vivo model to study NSAID-induced intestinal toxicity. *Toxicol. In Vitro* 2014, 28 (7), 1296–1305.
 26. *Noben M, Vanhove W, Arnauts K, et al.* Human intestinal epithelium in a dish: Current models for research into gastrointestinal pathophysiology. *United European Gastroenterol J.* 2017;5(8):1073-1081.
 27. *Paulchamy B, Arthi G, Lignesh BD.* A Simple Approach to Stepwise Synthesis of Graphene Oxide Nanomaterial J. *Nanomed. Nanotechnol.* 2015 6: 253.
 28. *Ponce de León-Rodríguez MDC, Guyot JP, Laurent-Babot C.* Intestinal *in vitro* cell culture models and their potential to study the effect of food components on intestinal inflammation. *Food Sci Nutr.* 2019;59(13):2166-2168
 29. *Roberts, M. S.; Magnusson, B. M.; Burczynski, F. J.; Weiss, M.* Enterohepatic circulation. *Clin. Pharmacokinet.* 2002, 41 (10), 751–790
 30. *Singh Z.* Applications and toxicity of graphene family nanomaterials and their composites. *Nanotechnol Sci Appl.* 2016; 9:15-28.
 31. *Suk JW, Lee WH, Lee J, et al.* Enhancement of the electrical properties of graphene grown by chemical vapor deposition via controlling the effects of polymer residue. *Nano Lett.* 2013;13(4):1462–1467.
 32. *Tiwari, S. K., Sahoo, S., Wang, N., & Huczko, A.* Graphene research and their outputs: Status and prospect. *J SCI-ADV MATER DEV.* 2020, 5(1), 10–2907.
 33. *Zainuddin, M.F, Nik Raikhan, N,H, Othman, N, H and Abdullah, W,G,H.* Synthesis of reduced Graphene Oxide (rGO) using different treatments of Graphene Oxide (GO). *Conf. Ser. Mater. Sci. Eng* 2018.
 34. *Zuchowska A, Dabrowski B, Jastrzebska E, et al.* Cytotoxic properties of graphene derivatives depending on origin and type of cell line. *J. Mater. Sci. Eng.* 2020;35(18):2385-2395. 358 012046