

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR  
MESTRADO

JÉSSICA CAVALHEIRO SOARES

**EFETOS NEUROTÓXICOS DA EXPOSIÇÃO AO ÓXIDO DE GRAFENO EM  
LARVAS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Porto Alegre

2017

## Ficha Catalográfica

S676e Soares, Jéssica Cavalheiro

Efeitos neurotóxicos da exposição ao óxido de grafeno em larvas de zebrafish (Danio rerio) / Jéssica Cavalheiro Soares . – 2017.

66 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Reis Bogo.

1. óxido de grafeno. 2. neurotoxicologia. 3. nanotoxicologia. 4. larvas de zebrafish. 5. dopamina. I. Bogo, Maurício Reis. II. Título.

**JÉSSICA CAVALHEIRO SOARES**

**EFEITOS NEUROTÓXICOS DA EXPOSIÇÃO AO ÓXIDO DE GRAFENO EM  
LARVAS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada como Requisito para  
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Molecular da Faculdade de Biociências da  
Pontifícia Universidade Católica do Rio  
Grande do Sul

**Orientador:** Prof. Dr. Maurício Reis Bogo

Porto Alegre, RS

2017

## RESUMO

Estudos recentes têm mostrado diversas aplicações do óxido de grafeno (GO) como agente de contraste para fins de diagnóstico, para o endereçamento de drogas (do inglês *drug delivery*) de fármacos anticarcinogênicos, proteínas e peptídeos e na área de engenharia tecidual para aplicações na regeneração de lesões nervosas. O avanço em pesquisas relacionadas a aplicações do GO em neurologia exige a investigação dos mecanismos de ação potencialmente tóxicos desencadeados pela exposição ao nanomaterial. O *zebrafish* (*Danio rerio*) tem sido amplamente utilizado em ensaios neurotoxicológicos devido à homologia de processos bioquímicos e estruturas neurais com outros vertebrados, visíveis desde o início de seu desenvolvimento externo. Para investigar os efeitos neurotóxicos da exposição a diferentes concentrações do GO no período de desenvolvimento, foram avaliados diversos parâmetros *in vivo* para avaliação toxicológica preliminar. Foi verificado que o GO não induziu alterações na sobrevivência, eclosão e movimentos espontâneos. Contudo, o aumento dos batimentos cardíacos em 48 hpf foi constatado e redução do tamanho do eixo axial, sem alteração na área ocular em 5 dpf. Adicionalmente, análises moleculares da expressão de genes específicos para proteínas do sistema nervoso foram realizadas mostrando que o GO aumenta a expressão de *sinapsina IIa* e reduz a expressão do transportador de dopamina (*dat*), sugerindo um provável mecanismo compensatório. A avaliação da locomoção dos animais expostos ao GO mostra o aumento do ângulo absoluto de virada. Com base nestes parâmetros iniciais, foram realizadas análises bioquímicas para a determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e dosagem dos níveis de dopamina. A exposição ao GO não alterou a atividade da AChE e reduziu os níveis de dopamina. Adicionalmente, a expressão do gene de linfoma de células B2 (do inglês *B cell lymphoma 2 (bcl2)*) e do gene que codifica para caspase 3 (*casp3*) foram avaliadas para o grupo de larvas expostas ao GO onde foi mostrado aumento da expressão de *bcl2*, enquanto que a expressão de *casp3* permaneceu inalterada, sugerindo que o GO parece não induzir mecanismo de apoptose. A estrutura tecidual e celular do cérebro de larvas de *zebrafish* expostas ao GO foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) onde morte celular por necrose com perda da arquitetura celular foi constatada. Estudos adicionais para o completo entendimento das alterações neurológicas observadas pela exposição ao GO e dos mecanismos envolvidos nesse processo são necessários.

**Palavras-chave:** óxido de grafeno, neurotoxicologia, nanotoxicologia, larvas de zebrafish, dopamina

## ABSTRACT

Recent studies have shown several applications of graphene oxide (GO) in neurology in the imaging area as a contrast agent for diagnostic purposes, for drug delivery of anticarcinogenic drugs, proteins and peptides and in the field of tissue engineering for applications in the regeneration of nervous lesions. Advances in GO applications research in neurology require addressing its potential toxic mechanisms of action. Zebrafish (*Danio rerio*) has been widely used in neurotoxicological trials due to the homology of biochemical processes and neural structures with vertebrates. To investigate the potential neurotoxic effects of GO exposure in different concentrations at development period, we evaluated *in vivo* parameters for initial toxicological screening. We found that GO did not induce changes in survival, hatching and spontaneous movement. However, an increase in heart rate at 48 hpf was found and a reduction in body length without altering the ocular area at 5 dpf. Additionally, molecular gene expression analyses of nervous system-related proteins were performed, showing *synapsin IIa* expression is increased and dopamine transporter (*dat*) gene expression is reduced, suggesting a potential compensatory mechanism. The evaluation of the locomotion behavior of animals exposed at GO showed an increase in the absolute turn angle. Based on these initial parameters, we performed biochemical analyzes to determination of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) activity and dopamine levels. The exposure at GO did not change AChE activity and decreased dopamine levels. Additionally, the gene expression of B cell lymphoma 2 (*bcl2*) gene and caspase 3 (*casp3*) gene were evaluated for the group of larvae exposed to GO, demonstrating an increase of *bcl2* and unchanged *casp3* expression, suggesting no apoptosis involvement. The tissue and cellular structure of zebrafish larvae brain exposed at GO was evaluated by transmission electron microscopy (TEM) and cell dead by autophagosome formation with loss of cellular architecture was observed most likely due to exposure to the nanomaterial. Further studies are necessary to the complete understanding of the neurological changes observed in zebrafish by exposure to GO and the mechanisms involved in this process, are necessary.

**Keywords:** Graphene oxide, neurotoxicology, nanotoxicology, zebrafish larvae, dopamine

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>RESUMO</b> .....   | 4  |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | 5  |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 7  |
| <b>1.1 Nanotecnologia</b> .....   | 7  |
| <b>1.2 Óxido de grafeno</b> .....   | 8  |
| <b>1.3 Aplicações biomédicas</b> .....  | 10 |
| <b>1.4 Nanotoxicologia do óxido de grafeno</b> .....  | 11 |
| <b>1.5 Zebrafish: Modelo em experimentação animal no campo da nano/neurotoxicologia</b> ..... | 13 |
| <b>1.6 Sistemas coloidais com o óxido de grafeno</b> .....                                    | 17 |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | 19 |

# 1. INTRODUÇÃO

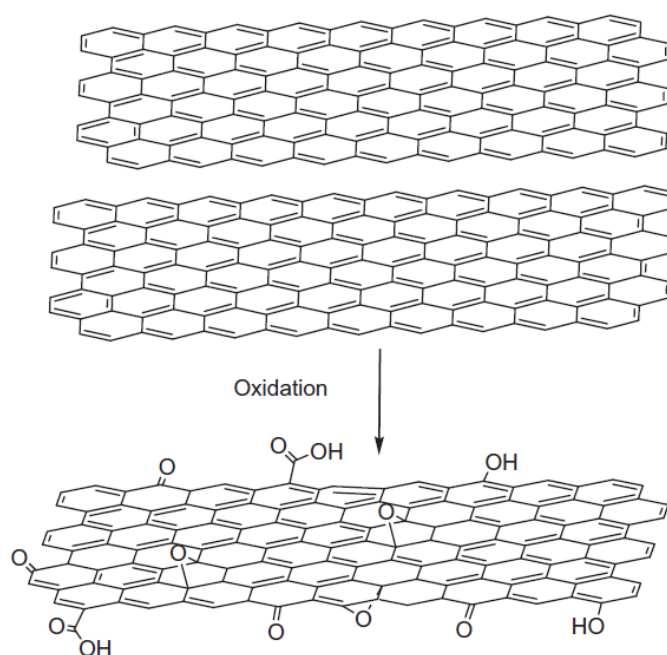
## 1.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia apresenta como base, o desenvolvimento de materiais através do controle da matéria em escala atômica e molecular com estruturas dimensionadas para a escala nanométrica podendo variar de 1 a 100 nanômetros (Kaur et al. 2015). O redimensionamento à escala nanométrica modifica as propriedades físico-químicas do material como a química de superfície (do inglês *surface chemistry*), a composição, a pureza, a condutividade e propriedades mecânicas (Cheng et al. 2017), conferindo características excepcionais a estes nanomateriais que têm sido amplamente investigados para diversas aplicações. Do ponto de vista geométrico, nanoestruturas helicoidais podem ser aplicadas como dispositivos mecânicos em micro(nano)-sistemas em função do efeito de confinamento quântico resultante da forma e tamanho, contribuindo para o desenvolvimento de novos dispositivos semi-condutores (Ren & Gao 2014). Somado a isso, nanomateriais podem ser utilizados na otimização de estocagem de energia em baterias, como tem sido previamente demonstrado em um estudo recente com o óxido de grafeno reduzido (Ghulam et al. 2017). Adicionalmente, supercapacitores híbridos são reconhecidos pela geração e armazenamento de energia, onde a adição de eletrodos nanoestruturados, principalmente a base de nanomateriais ocos (do inglês *hollow nanomaterials*), confere menor comprimento para difusão de transporte de íons e robusta arquitetura, contribuindo para o aumento da capacidade do sistema (Yu et al. 2017). Entre os nanomateriais de carbono, o fulereno  $C_{60}$  tem demonstrado aplicações como terapêutico no reestabelecimento da fadiga muscular em ratos (Prylutsky et al. 2017). Além disso, a adição de grupos funcionais e moléculas na estrutura de nanomateriais, processo conhecido como funcionalização, como por exemplo, em nanotubos de carbono, permite a modificação de propriedades físico-químicas e aumento da biocompatibilidade em um sistema biológico (Zarbin & Oliveira 2013). A hidrofobicidade de nanomateriais pode refletir na redução da biocompatibilidade e excreção em um sistema in vivo, onde a funcionalização permite a redução da ocorrência destes efeitos aumentando a excreção via rota renal e conseqüentemente reduzindo a bioacumulação (Lacerda et al. 2006). Tendo em vista as diversas aplicações dos nanomateriais em diferentes áreas em função das propriedades excepcionais obtidas através do redimensionamento à escala nanométrica, os estudos

neste cenário têm aumentado e mostram-se promissoras para novas aplicações visando como, por exemplo, o redirecionamento de fármacos acoplados a superfície de nanopartículas.

## 1.2 Óxido de grafeno

O óxido de grafeno (GO) é um nanomaterial obtido através do processo de esfoliação do grafite apresentando bidimensionalidade e espessura monoatômica (Novoselov et al. 2004). Destaca-se por apresentar hexágonos de carbono em sua primeira zona de Brillouin com um longo sistema  $\pi$  conjugado, o que atribui um confinamento eletrônico bidimensional, responsável pelas excepcionais propriedades deste nanomaterial, tais como a alta mobilidade eletrônica e resistência mecânica (Singh et al. 2011). Em grande parte das pesquisas realizadas com GO, este nanomaterial é obtido através da oxidação química do grafite com o uso de agentes oxidantes que podem incluir ácido sulfúrico concentrado, ácido nítrico ou ainda permanganato de potássio baseando-se no método de Hummer (Hummers & Offeman 1958) (**Figura 1**). Outro método empregado para a obtenção de GO é descrito por Staudenmaier (Staudenmaier 1898) envolvendo ácido nítrico, ácido sulfúrico e clorato de potássio. GO é amplamente oxigenado com grupos hidroxila e epóxi em carbonos  $sp^3$  hibridizados, além de grupos carbonila e carboxila nas extremidades, ligados a carbonos  $sp^2$  hibridizados (Singh et al. 2011).

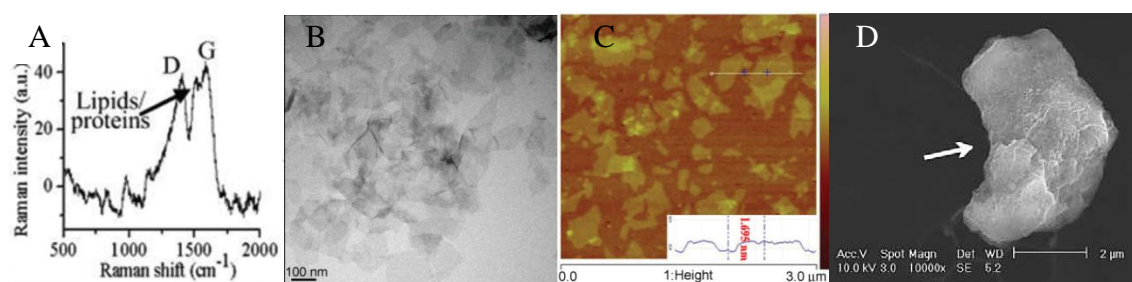


**Figura 1: Oxidação do grafite a óxido de grafeno.** Adaptado de Singh et al. (2011)



Tendo em vista que as propriedades físico-químicas do nanomaterial como a área de superfície, número de camadas, dimensão lateral, pureza e superfície química (Liu et al. 2013) podem influenciar no potencial para aplicações biomédicas, várias metodologias têm sido utilizadas na pesquisa a fim de caracterizar esse nanomaterial após sua obtenção (**Figura 2**) e avaliar posteriormente seus efeitos na medicina.

A espectroscopia Raman tem sido amplamente aplicada para a caracterização do GO, apresentando picos correspondentes as bandas D (~1350nm) e G (~1580nm) geradas através de vibração ótica planar (Figura 2A). Assim, tem sido proposto que esta metodologia pode ser utilizada para avaliar a “qualidade” do nanomaterial e determinar o número de camadas através da forma, dimensão lateral e posição 2D (Ferrari et al. 2006). Adicionalmente, outras metodologias como Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) pode ser aplicada para caracterização de materiais nanocristalinos, particularmente para a forma da partícula (Figura 2B). Já a Microscopia de Força Atômica (AFM) fornece imagens em resolução atômica de grandes superfícies de cristais (Figura 2C) (Wang 2000), enquanto a Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) é aplicada para análises que exijam detalhamento do nanomaterial com grande profundidade de campo detectando variações de superfície (Figura 2D) (Oatley et al. 1965). Assim, a utilização de um conjunto considerável de metodologias permite o detalhamento acerca da estrutura e eficiência do processo de obtenção de GO a partir do grafite.

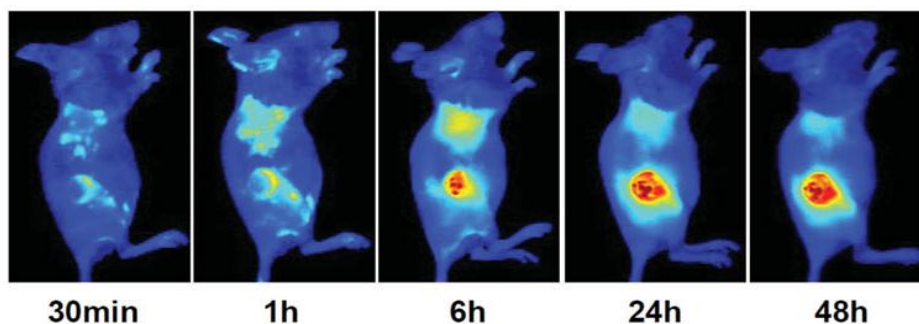


**Figura 2: Diferentes metodologias utilizadas para caracterização de nanomateriais.** (A) Espectroscopia Raman do GO (Ren et al. 2016), (B) Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) do GO (Zhang et al. 2010), (C) Microscopia de força atômica (AFM) do GO (Zhang et al. 2010) e (D) Microscopia eletrônica de varredura (SEM) de nanotubos de carbono (Cheng et al. 2007).

### 1.3 Aplicações biomédicas

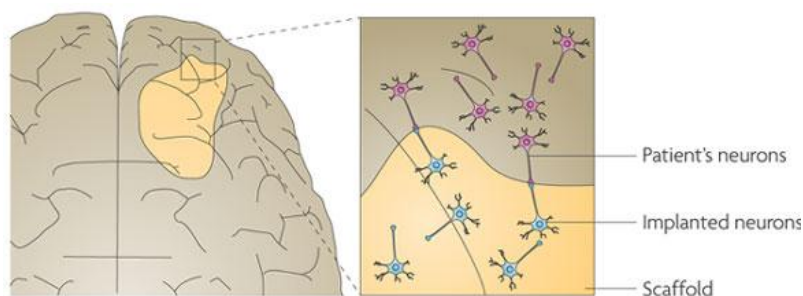
Propriedades físico-químicas excepcionais fazem do GO um material versátil para várias aplicações biomédicas. Sua estrutura aromática permite a absorção de luz na faixa do infravermelho próximo (700-900 nm) em função de grupos oxigênio presentes nas bordas do nanomaterial que são susceptíveis a modificações estruturais, adaptando a absorção de luz em diferentes posições espectrais (Yang et al. 2012). Estudos têm demonstrado as potenciais aplicações do GO no ramo de imagem (**Figura 3**), como agente de contraste para fins de diagnóstico de tumores e também terapia foto termal (Yang et al. 2012). Além disso, outras aplicações em áreas biomédicas têm sido investigadas como a utilização de GO para o direcionamento de drogas (do inglês *drug delivery*) de fármacos anticarcinogênicos (Zhang et al. 2010), de proteínas, de peptídeos, de anticorpos, e de DNA/RNA (Liu et al. 2013) e na engenharia de tecidos para aplicações na regeneração de lesões nervosas (Tang et al. 2013).

No âmbito da neurologia, as funções cerebrais podem ser afetadas como consequência de infecções, hipóxia, doenças degenerativas crônicas, traumas e principalmente danos associados a doenças neurodegenerativas (Orive et al. 2009). Nestes casos, a perda de populações específicas de neurônios leva ao surgimento de sintomas neurológicos e psiquiátricos específicos de cada doença em questão. Como alternativa de tratamento, há processos de reparo cerebrais que podem ser estimulados através da utilização de *scaffolds* a base de nanomateriais, inseridos na região específica que ocorre o dano neuronal, a fim de proporcionar suporte estrutural ao tecido circundante, minimizando a degeneração celular secundária e permitindo que as células do parênquima adjacente infiltrem no *scaffold*, promovendo a regeneração dos tecidos locais (Orive et al. 2009) (**Figura 4**).



**Figura 3: Imagem multimodal de camundongos com tumor 4T1 após diferentes tempos de administração intravenosa contendo nanopartículas de grafeno. Adaptado de Yang et al. (2012)**

Os *scaffolds* degradáveis ou não degradáveis podem ser produzidos na forma de nanogéis, sendo mais adequados a aplicações em casos de reparo cerebral, e na forma de canais tubulares para regeneração de nervos periféricos e reparos axonais na medula espinhal (Orive et al. 2009). *Scaffolds* produzidos a base de GO têm sido estudados em cultura de células-tronco pluripotentes, demonstrando a biocompatibilidade desse nanomaterial e a potencialização dos mecanismos de aderência e proliferação celular (G.-Y. Chen et al. 2012). Li *et al* (2011) utilizaram neurônios do hipocampo de camundongos dispostos em *scaffold* sintetizado a base de grafeno e demonstraram que esse nanomaterial é capaz de favorecer a formação e crescimento de neuritos, amplamente reconhecidos pelo desenvolvimento do sistema nervoso, além de aumentar a expressão de proteína 43 associada a crescimento (GAP43), expressa em processos de regeneração e neurogênese. Somado a isso, os efeitos de filmes de grafeno utilizados como suporte em células tronco neurais foram previamente avaliados, demonstrando o aumento do número de neurônios e frequência de correntes sinápticas, achados imprescindíveis para a avaliação do potencial deste nanomaterial em aplicações neurológicas (Tang et al. 2013).



**Figura 4:** Desenho ilustrativo de *scaffold* em região cerebral específica. Adaptado de Orive et al. (2009)

#### 1.4 Nanotoxicologia do óxido de grafeno

O aumento de estudos focados em novas aplicações do GO apresenta como principal consequência a dispersão aérea de nanopartículas durante sua obtenção que pode trazer riscos aos indivíduos que as manipulam, bem como ao ambiente, em decorrência de derramamentos acidentais e descarga de efluentes (Pretti et al. 2014). Desta forma, estudos de nanotoxicologia tornam-se imprescindíveis para avaliar os

efeitos negativos que os nanomateriais podem causar a saúde e ao ambiente (Ray et al. 2009).

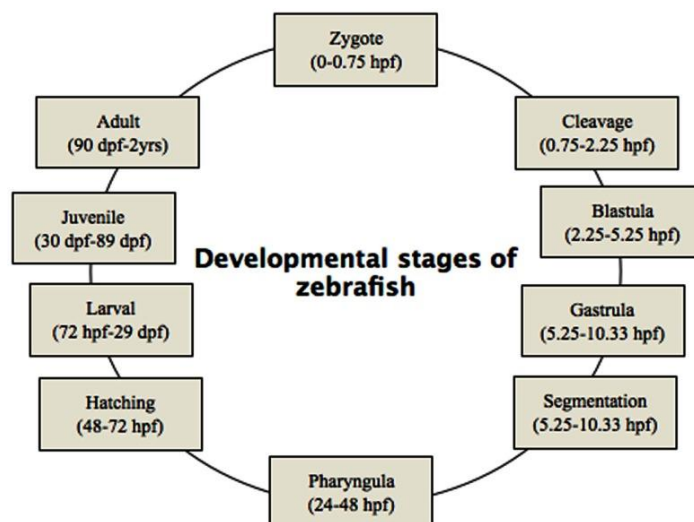
Os efeitos tóxicos do óxido de grafeno (OG) têm sido estudados sob diversos parâmetros como: reprodução (Xu et al. 2015; Liang et al. 2015), farmacocinética (Yang et al. 2011), toxicidade embrionária (Chen et al. 2015), citotoxicidade (Hu et al. 2011) e imunologia (Orecchioni et al. 2014). Os efeitos da exposição a este nanomaterial em modelos *in vivo* têm sido também investigados. Larvas de *zebrafish* expostas ao OG (5, 10, 50 e 100 mg/L) durante 96 horas apresentam redução da frequência cardíaca, porém, sem alterações na eclosão e tamanho corporal (Liu et al. 2014). Morte celular programada (apoptose) não ocorre em embriões de *zebrafish* expostos ao OG (25 e 50 mg/L), em 50 mg/L o GO levou ao atraso da eclosão em 60 hpf, além do fenótipo larval apresentar espinha curvada e crescimento atrofiado após 120 horas de exposição (L. Q. Chen et al. 2012). Em *zebrafish* adultos, a exposição à suspensões do GO (1, 5 e 10 mg/L) induz o aumento da expressão para as citocinas inflamatórias IL-6 e IL-1 $\beta$  e somado a isso, a concentração de 5 mg/L induziu o aumento da expressão para TNF $\alpha$  (Chen et al. 2016). Além disso, pode desencadear processos de estresse oxidativo em todas as concentrações testadas através do aumento de peroxidação lipídica e redução de glutatona reduzida após uma hora de exposição.

Em camundongos, a exposição via oral ao GO (0.5 mg/mL<sup>-1</sup>) durante 38 dias, resultou na redução do tamanho e peso corporal, bem como atrofia do fígado e disfunções no trato gastrointestinal, porém sem alterações comportamentais (Fu et al. 2015). Quando GO (25 mg/kg) é administrado via intraperitoneal e/ou intravenosa em camundongos machos, leva ao acúmulo renal da nanopartícula após 35 dias da exposição (Liang et al. 2015). Contudo, apenas um estudo relacionou *in vivo*, os efeitos da exposição durante 24 horas ao GO sobre o sistema nervoso de larvas de *zebrafish*, demonstrando uma redução dose dependente (0.01, 0.1 e 1  $\mu$ g/L) de movimentos espontâneos e perda de neurônios dopaminérgicos (Ren et al. 2016). Desta forma, não há estudos que relacionem simultaneamente os efeitos tóxicos da exposição ao GO sobre parâmetros moleculares, bioquímicos, celulares e de locomoção envolvendo o funcionamento do sistema nervoso.

### 1.5 Zebrafish: Modelo em experimentação animal para nano/neurotoxicologia

O teleósteo *zebrafish* (*Danio rerio*), pertencente à família *Cyprinidae* (Spence et al. 2008), tem sido amplamente utilizado em função de características excepcionais que possui, tais como: alta reprodutibilidade, rápido desenvolvimento, transparência dos embriões e aquiescência para *screenings* genéticos (Strähle et al. 2012; Chakraborty & Agoramoorthy 2010). Os ovos de *zebrafish* eclodem rapidamente e as larvas iniciam a alimentação em torno do 5º dia de vida (Easter & Nicola 1996). Somado a isso, órgãos e tecidos podem ser visualizados *in vivo* devido ao desenvolvimento exclusivamente externo (Fishman 1999; Parichy et al. 2009). Outra grande vantagem em utilizar o *zebrafish* ocorre pela similaridade dos sistemas cardiovascular, nervoso e digestivo com mamíferos (Hsu et al. 2007). A rápida ontogênese (Link & Megason 2008), redes de sinalizações altamente conservadas encontradas neste modelo animal e em humanos com alto nível de similaridade genômica (Beliaeva et al. 2010), além de barreira hematoencefálica, células endoteliais e respostas imunogênicas (Fako & Furgeson 2009), torna o *zebrafish* um modelo atrativo para estudos durante o período de desenvolvimento (Link & Megason 2008).

O desenvolvimento do *zebrafish* inicia no estágio de zigoto e é finalizado ao atingir a idade adulta aproximadamente em 90 dpf (**Figura 5**). Em 24 horas pós-fertilização (hpf) o eixo do corpo dos embriões está consolidado e todas as células precursoras, tecidos cerebrais, olhos e coração podem ser observados através de microscopia de luz (Stainier & Fishman 1994). As larvas eclodem entre 2,5 a 3 dias pós-fertilização (dpf), apresentando baixa mobilidade aproximadamente até o 5º dia de vida, posteriormente a bexiga natatória é inflada e *free swimming* é observado (Dammski & Müller 2011).



**Figura 5:** Estágios do desenvolvimento do *zebrafish*, de zigoto a adulto. Obtido de Hosen et al. (2013)

O *zebrafish* também se tornou um importante modelo biológico em ensaios neurotoxicológicos devido à homologia em processos bioquímicos e estruturas neurais com outros vertebrados (Linney et al. 2004), apresentando todos os neurotransmissores típicos de vertebrados, como por exemplo, a acetilcolina (ACh), tanto no sistema nervoso central (Mueller et al. 2004) quanto no periférico (Bertrand et al. 2001). Além disso, diferentemente de mamíferos que possuem as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) que realizam a hidrólise da acetilcolina e assim mantêm a homeostase desse neurotransmissor na fenda sináptica (Bhupendra et al. 1998), o *zebrafish* possui apenas a expressão da AChE (Bertrand et al. 2001) que apresenta papel neuromodulatório na atividade locomotora (Mueller et al. 2004), tornando-o um modelo adequado para *screening* neurotoxicológico através da avaliação da atividade e expressão desta enzima, além de parâmetros comportamentais (Richendrfer & Creton 2015).

A capacidade de neurônios pós-mitóticos estenderem longos axônios é essencial tanto para o estabelecimento de circuito neural durante o desenvolvimento, quanto para a regeneração de axônios que sofrem danos na vida adulta. O crescimento axonal é regulado por vias de sinalização, que são ativadas por meio da expressão de genes específicos que codificam proteínas abundantes em cones de crescimento. A expressão de tais genes é iniciada em neurônios pós-mitóticos imediatamente antes do crescimento axonal e terminada subsequentemente para a formação de sinapses (Udvadia et al. 2001). A proteína 43 associada ao crescimento (GAP-43) é expressa durante todo o desenvolvimento do *zebrafish*, tanto na vida adulta como durante os processos de

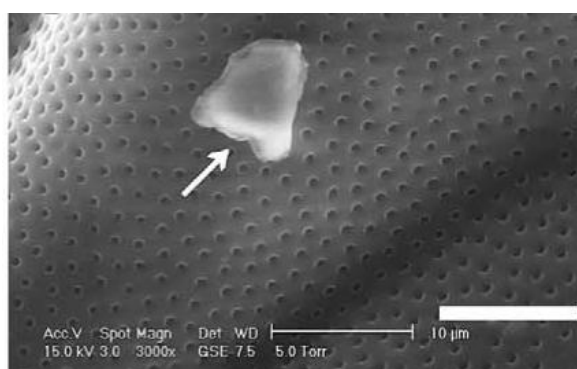
regeneração (Udvardi 2009). Os padrões de expressão de vários genes que codificam proteínas neurais em larvas de *zebrafish* foram avaliados, como potenciais marcadores de neurotoxicidade durante o desenvolvimento (Fan et al. 2010). Os genes avaliados foram os que codificam GAP-43, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), Nestina, Neurogenina 1 e Sinapsina IIa demonstrando serem excelentes marcadores para estudos de neurotoxicidade (**Tabela 1**).

Embriões e larvas de *zebrafish* têm sido utilizados para avaliação do potencial toxicológico de nanomateriais de carbono (Park et al. 2013; Chen et al. 2012; Chen et al. 2013; Zhou et al. 2012) e grafeno (Chen et al. 2012), pois os embriões apresentam fácil absorção e distribuição de nanomateriais devido ao caráter morfológico do córion com vilosidades e poros distribuídos em sua superfície (**Figura 6**) (Chen et al. 2012).

A exposição do *zebrafish* ao grafeno em determinadas fases importantes do seu desenvolvimento, como a embriogênese, pode levar a diferentes efeitos tóxicos como malformações e até mesmo hipóxia (Chen et al. 2015). Apesar da embriogênese estar completa em aproximadamente 72 hpf, a maioria dos órgãos internos como o intestino, fígado e rins, além do sistema cardiovascular estão completamente formados em 96 hpf (Stainier & Fishman 1994). Em função disso, os embriões de *zebrafish* são amplamente utilizados em nanotoxicologia a fim de avaliar os efeitos de nanopartículas durante esse estágio de vida (King Heiden et al. 2007).

**Tabela 1:** Genes utilizados para *screening* neurotoxicológico.

| Gene   | Descrição  | Referência              |
|--|--|-------------------------|
| Todos os genes são regulados positivamente em: |  |                         |
| GAP 43   | Desenvolvimento e regeneração                      | Udvardia et al. (2009)  |
| GFAP   | Astróglia  | Chen et al. (2012)      |
| Nestina  | Proliferação neural                                | Mahler & Driever (2007) |
| Neurogenina 1                                  | Direcionamento da formação de neurônios sensoriais | Mc Graw et al (2008)    |
| Sinapsina IIa                                  | Sinaptogênese e liberação de neurotransmissores    | Kao et al (1998)        |

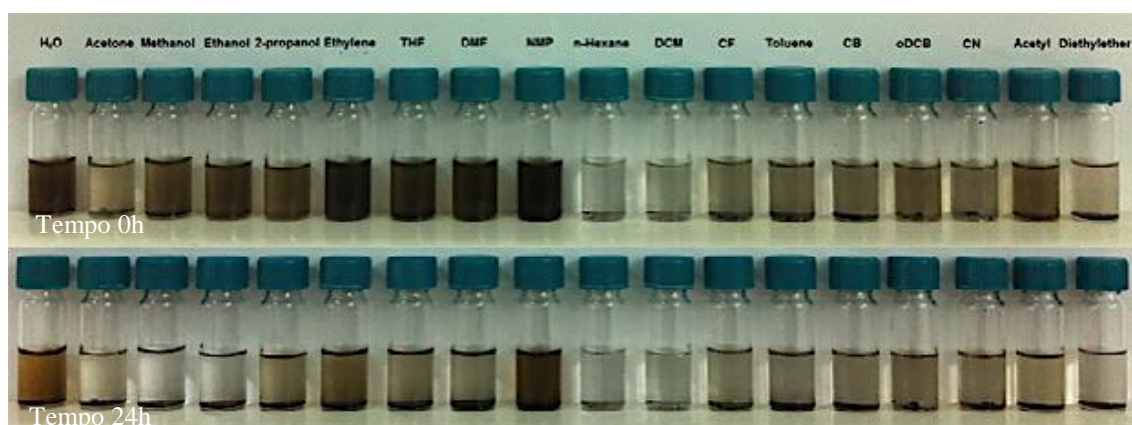


**Figura 6:** Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura (SEM) do córion de embriões de *zebrafish* de 24 hpf. A seta mostra um aglomerado de nanotubos de carbono de parede única. Adaptado de Cheng et al. (2007).



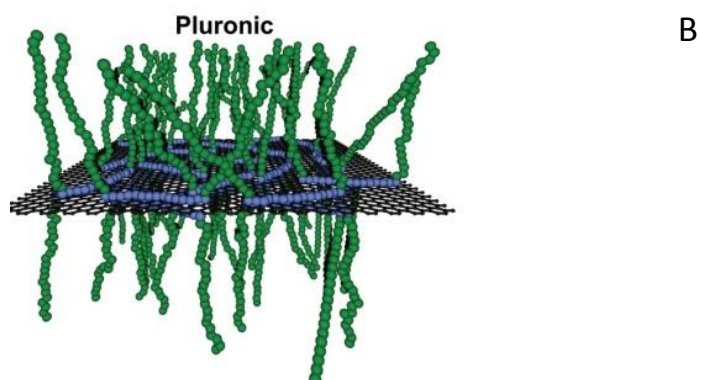
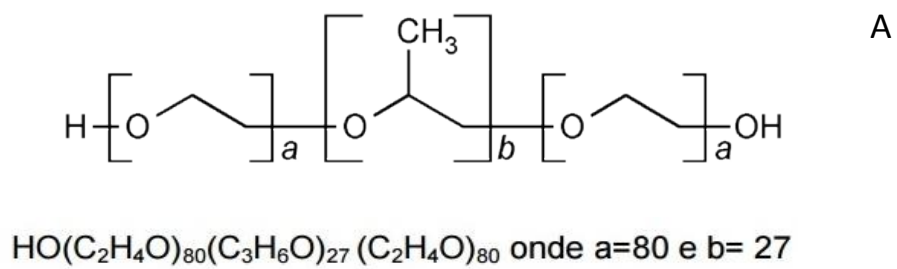
## 1.6 Sistemas coloidais com o óxido de grafeno

Nanopartículas de óxido de grafeno (GO) apresentam a característica de aglomeração e instabilidade quando em suspensão. Apesar de formar pontes de hidrogênio na presença de água, GO apresenta a característica de precipitação com o tempo o que aumenta proporcionalmente com a concentração do nanomaterial (Chen et al. 2016). Somado a isso, diferentes efeitos são observados em estudos toxicológicos devido a esses fatores. A utilização de dispersantes como veículo tem se mostrado capaz de melhorar a biocompatibilidade do grafeno e sua biodistribuição em tecidos de camundongos (Duch et al. 2011). A dispersão do GO na presença de 18 dispersantes diferentes incluindo água foi avaliada anteriormente (**Figura 7**) (Konios et al. 2014), contudo, todos os dispersantes que efetivamente permitiram a estabilidade das suspensões são tóxicos, inviabilizando o uso dos mesmos para aplicações em sistemas biológicos.



**Figura 7:** Suspensões contendo óxido de grafeno e diferentes dispersantes. Adaptado de Konios et al. (2014)

O polímero *Pluronic F-68* (PF-68) apresenta uma região central hidrofóbica (óxido de polipropileno) circundada por domínios hidrofílicos (óxido de polietileno) com tamanhos de cadeia idênticos (**Figura 8A**). Sua principal característica é a formação de micelas com partículas hidrofóbicas, através da adsorção de grupos apolares da partícula a ser solubilizada e o polímero (**Figura 8B**). PF68 foi utilizado para dispersar nanotubos de carbono de parede única (SWCNTs) em água, não apresentando qualquer efeito tóxico em *zebrafish* (Pan et al. 2011).



**Figura 8:** Molécula do surfactante Pluronic F-68 (A), o tamanho da cadeia (a, b) e diagrama esquemático de nanolâmina de grafeno interagindo com a cadeia hidrofóbica (azul) de PF-68 (B). Adaptado de (Seo et al. 2011; Gouveia 2011).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blazina, A.R., Vianna, M.R. & Lara, D.R. The spinning task: a new protocol to easily assess motor coordination and resistance in zebrafish. *Zebrafish*. 10(4): 480–5, 2013.
- Chen, G.-Y. et al. A graphene-based platform for induced pluripotent stem cells culture and differentiation. *Biomaterials*. 33(2): 418–27, 2012.
- Chen, L.Q. et al. Toxicity of graphene oxide and multi-walled carbon nanotubes against human cells and zebrafish. *Science China Chemistry*. 55(10): 2209–2216, 2012.
- Chen, M. et al. Oxidative stress and immunotoxicity induced by graphene oxide in zebrafish. *Aquatic Toxicology*. 174: 54–60, 2016.
- Chen, Y. et al. Specific nanotoxicity of graphene oxide during zebrafish embryogenesis. *Nanotoxicology*. 5390: 1–11, 2015.
- Cheng, C. et al. Functional Graphene Nanomaterials Based Architectures: Biointeractions, Fabrications, and Emerging Biological Applications. *Chemical Reviews*. 6b00520, 2017.
- Cheng, J., Flahaut, E. & Cheng, S.H. Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental toxicology and chemistry*. 26(4): 708–716, 2007.
- Ferrari, A.C. et al. Raman spectrum of graphene and graphene layers. *Physical Review Letters*. 97(18), 2006.
- Forno, L. Neuropathology of Parkinson's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 55(3): 259–272, 1996.
- Fu, C. et al., 2015. Effects of graphene oxide on the development of offspring mice in lactation period. *Biomaterials*. 40: 23–31, 2015.
- Ghulam, A. et al. Reduced graphene oxide as a stable and high-capacity cathode material for Na-ion batteries. *Nature Scientific Reports*. 7: 40910, 2017.
- Hu, W. et al. Protein corona-mediated mitigation of cytotoxicity of graphene oxide. *ACS Nano*. 5(5): 3693–3700, 2011.
- Hummers, W.S. & Offeman, R.E. Preparation of Graphitic Oxide. *Journal of the American Chemical Society*. 80(6):1339–1339, 1958.

- Kaur, M. et al. Nanotechnology: A Review. *National Conference on Advances in manufacturing Systems*. 23–24, 2015.
- Kiraz, Y. et al. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biology*. 37(7): 8471–8486, 2016.
- Lacerda, L. et al. Carbon nanotubes as nanomedicines: From toxicology to pharmacology. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 58(14): 1460–1470, 2006.
- Liang, S. et al. Reproductive toxicity of nanoscale graphene oxide in male mice. *Nanotoxicology*. 9(1): 92–105, 2015.
- Liu, J., Cui, L. & Losic, D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomaterialia*. 9(12): 9243–9257, 2013.
- Liu, X. et al. Toxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes, Graphene Oxide, and Reduced Graphene Oxide to Zebrafish Embryos. *Biomedical and Environmental Sciences*. 27(9): 676–683, 2014.
- Novoselov, K.S. et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*. 306 (5696): 666–669, 2004.
- Oatley, C.W., Nixon, W.C. & Pease, R.F.W. Scanning Electron Microscopy. *Adv. Electronics Electron Phys*. 21: 181–247, 1965.
- Orecchioni, M. et al. Impact of carbon nanotubes and graphene on immune cells. *Journal of translational medicine*. 12(1): 138, 2014.
- Orive, G. et al. Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration. *Nature reviews. Neuroscience*. 10(9): 682–692, 2009.
- Pretti, C. et al. Ecotoxicity of pristine graphene to marine organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 101(1): 138–145, 2014.
- Prylutskyy, Y.I. et al. C60 fullerene as promising therapeutic agent for correcting and preventing skeletal muscle fatigue. *Journal Nanobiotechnology*. 15(8), 2017.
- Ray, P.C., Yu, H. & Fu, P.P. Toxicity and environmental risks of nanomaterials: challenges and future needs. *Journal of environmental science and health*. 27(1): 1–35, 2009.
- Ren, C. et al. Ultra-trace graphene oxide in a water environment triggers Parkinson's disease-like symptoms and metabolic disturbance in zebrafish larvae. *Biomaterials*. 93: 83–94, 2016.

- Ren, Z. & Gao, P.-X. A review of helical nanostructures: growth theories, synthesis strategies and properties. *Nanoscale*. 6: 9366–9400, 2014.
- Sallinen, V. et al. MPTP and MPP<sup>+</sup> target specific aminergic cell populations in larval zebrafish. *Journal of Neurochemistry*. 108(3): 719–731, 2009.
- Singh, V. et al. Graphene based materials: Past, present and future. *Progress in Materials Science*. 56(8): 1178–1271, 2011.
- Staudenmaier, L. Verfahren zur Darstellung der Graphitsäure. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 1481-1487, 1898.
- Tang, M. et al. Enhancement of electrical signaling in neural networks on graphene films. *Biomaterials*. 34(27): 6402–6411, 2013.
- Villanueva, M. et al. Synapsin II negatively regulates catecholamine release. *Brain Cell Biology*. 35(2-3): 125–136, 2006.
- Wang, Y. et al. Inhibition effect of graphene oxide on the catalytic activity of acetylcholinesterase enzyme. *Luminescence*. 30(7): 940–946, 2015.
- Wang, Z.L. Transmission Electron Microscopy of Shape-Controlled Nanocrystals and Their Assemblies. *The Journal of Physical Chemistry B*. 104(6): 1153–1175, 2000.
- Xi, Y. et al. Transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein in dopaminergic neurons of the ventral diencephalon. *Developmental dynamics*. 240(11): 2539–47, 2011.
- Xu, S., Zhang, Z. & Chu, M. Long-term toxicity of reduced graphene oxide nanosheets: Effects on female mouse reproductive ability and offspring development. *Biomaterials*. 54: 188–200, 2015.
- Yang, K. et al. In vivo Pharmacokinetics, Long-Term Biodistribution, and Toxicology of PEGylated Graphene in Mice. *ACS Nano*. 5(1): 516–522, 2011.
- Yang, K., Hu, L., et al. Multimodal imaging guided photothermal therapy using functionalized graphene nanosheets anchored with magnetic nanoparticles. *Advanced Materials*. 24(14): 1868–1872, 2012.
- Yang, K., Wan, J., et al. The influence of surface chemistry and size of nanoscale graphene oxide on photothermal therapy of cancer using ultra-low laser power. *Biomaterials*. 33(7): 2206–2214, 2012.

Yu, L. et al. Complex Hollow Nanostructures: Synthesis and Energy-Related Applications. *Advanced Materials*. 1604563, 2017.

Zarbin, A.J.G. & Oliveira, M.M.. Nanoestruturas de carbono (nanotubos, grafeno): Quo vadis? *Quimica Nova*. 36(10): 1533–1539, 2013.

Zhang, L. et al. Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs. *Small*. 6(4): 537–544, 2010.