TRABALHO COMPLETO
FULL PAPER
XXVIII SEPE
Simpósio de Ensino, Pesquisa e Extensão
Teaching, Research and Extension Symposium
ISSN: 2316-9745
24 A 26 DE SETEMBRO DE 2024
SEPTEMBER 24th to 26th, 2024
UFN
https://doi.org/10.48195/sepe2024.28500

PERFIL DE SEGURANÇA *IN VITRO* DO ÓXIDO DE GRAFENO FUNCIONALIZADO COM HEPARINA

Caroline Arend Birrer[1]; Mylane Genro Santos[2]; Daniel Moro Druzian[3]; Klynsman Gambini Dornelles[1]; Thainá Barasuol Casarin[1]; Camila Medianeira Da Silva D'ávila[2]; Francine Carla Cadoná[4]; Francielle Liz Monteiro[4]

RESUMO

O óxido de grafeno funcionalizado com heparina (GO@Heparina) é composto por duas moléculas com inúmeras aplicações dentro da nanomedicina. Diante do grande potencial terapêutico que possui, é essencial avaliar o perfil de segurança dessas moléculas. Este estudo objetivou avaliar a citotoxicidade do óxido de grafeno (GO) e do GO@Heparina em células VERO, por meio do ensaio de viabilidade celular brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e ensaio de quantificação de DNA livre (DNA-PicoGreen®). Os resultados demonstraram que os tratamentos não causaram citotoxicidade significativa nas células, apesar de apresentar algumas limitações. A ausência de citotoxicidade, mesmo em concentrações mais elevadas, pode ser explicada pelo tempo relativamente curto de exposição. Diante disso, este estudo requer novos ensaios para validação dos resultados obtidos, bem como ensaios adicionais com novas concentrações e tempos de exposição.

Palavras-chave: Citotoxicidade; Antiviral; Nanomedicina.

ABSTRACT

Heparin-functionalized graphene oxide (GO@Heparin) is composed of two molecules with numerous applications in nanomedicine. Given its significant therapeutic potential, it is essential to evaluate the safety profile of these molecules. This study aimed to assess the cytotoxicity of graphene oxide (GO) and GO@Heparin in VERO cells using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) cell viability assay and the free DNA quantification assay (DNA-PicoGreen®). The results demonstrated that the treatments did not cause significant cytotoxicity in the cells, despite some limitations. The absence of cytotoxicity, even at higher concentrations, may be explained by the relatively short exposure time. Therefore, this study requires

[1] Curso de Biomedicina – Universidade Franciscana (caroline.abirrer@ufn.edu.br; k.dornelles@ufn.edu.br thaina.casarin@ufn.edu.br)
[2] Mestrado em Ciências da Saúde e da Vida – Universidade Franciscana (mylane.genro@ufn.edu.br; camila.davila@ufn.edu.br)
[3] Programa de Pós-Graduação em Nanociências – Universidade Franciscana (daniel.druzian@ufn.edu.br)
[4] Docentes do Mestrado em Ciências da Saúde e da Vida – Universidade Franciscana (f.cadona@ufn.edu.br; francielle.monteiro@ufn.edu.br)

further assays to validate the results obtained, as well as additional tests with new concentrations and exposure times.

Keywords: Cytotoxicity; Antiviral; Nanomedicine.

Eixo Temático: Atenção Integral e Promoção à Saúde (AIPS).

1. INTRODUÇÃO

A heparina trata-se de um glicosaminoglicano formado por sequências alternadas de glucosamina e ácido urônico (Meneghetti *et al*., 2015). Possui grande flexibilidade conformacional e diversidade estrutural, o que permite a interação com uma ampla variedade de proteínas (Atallah *et al*., 2020). Além disso, de acordo com Todosenko *et al*. (2022), a heparina possui papel importante em diversos processos biológicos, além de estar envolvida em diferentes vias de sinalização.

Seu uso como anticoagulante é conhecido há mais de 80 anos, demonstrando segurança e efeitos colaterais controláveis e limitados (Mycroft-West *et al*., 2020). Entre suas utilizações, está o tratamento de tromboses e coágulos relacionados à COVID-19 e, recentemente, tem sido estudada como potencial bloqueadora da entrada viral, sendo associada a efeitos imunomoduladores e antivirais, especialmente contra SARS-CoV-2 (Dos Santos *et al*., 2023).

Diante do grande potencial antiviral que possui, a heparina parece ser uma boa candidata como anti-herpética. Isso ocorre porque a heparina e o sulfato de heparan – um dos principais receptores utilizados pelos HSV-1 e HSV-2 para entrar na célula – são glicosaminoglicanos quimicamente relacionados, constituídos por sequências alternadas de glucosamina e ácido urônico (Meneghetti *et al*., 2015).

Ao considerar a aplicação da heparina como potencial anti-herpético, pressupõe-se que, apesar da semelhança com o receptor utilizado pelos HSV para a dar início à infecção, sozinha a heparina não poderia atuar na latência – situação em que o genoma viral se circulariza para formar um episssomo, em células não replicantes (neurônios) (Cohen, 2020) –, visto que o composto não atravessa a barreira hematoencefálica. Diante disso, emerge como alternativa a funcionalização da heparina com o óxido de grafeno (GO), a fim de aumentar a afinidade de ligação do sistema biológico, bem como permitir aplicações neurológicas, devido à capacidade

do GO de atingir o cérebro (Xiong *et al*., 2021).

Dentre as inúmeras propriedades apresentadas pelo GO, estão a elevada área superficial, biocompatibilidade, alta condutividade elétrica e térmica e estabilidade em meio aquoso, sendo uma das suas principais aplicações na nanomedicina atual a liberação controlada de fármacos e *drug delivery* (ou seja, o transporte de medicamentos até o tecido de interesse) (Wu; An; Hulme, 2015). Isso ocorre pois suas propriedades relacionadas à biocompatibilidade facilitam a funcionalização com biomoléculas, além de tornar simples a integração em sistemas multicamadas com aplicações em que a liberação controlada de moléculas bioativas é necessária (Oliveira *et al*., 2022).

A molécula de óxido de grafeno funcionalizado com heparina (GO@Heparina) já foi avaliado por Dos Santos *et al*. (2023) por meio de simulações computacionais, visando verificar se a molécula apresentava potencial antiviral, em especial para o vírus SARS-CoV-2. Os autores conseguiram demonstrar que o GO associado à heparina tornou-se mais atrativo para a ligação com a proteína Spike do vírus Sars-CoV-2 em comparação ao GO e à heparina isolados – o que indica um possível ganho na propriedade de bloqueio viral. Além disso, testes de caracterização da molécula demonstram propriedades hidrofílicas de sua superfície, devido à interação dos grupos funcionais do GO com a heparina, diminuindo a energia superficial dos átomos e resultando em um aumento da afinidade entre os compostos.

Nesse contexto, diante do grande potencial do GO como nanocarreador, de liberação controlada e com capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, e da semelhança molecular e estrutural da heparina com o sulfato de heparan, o composto GO@Heparina parece ser um bom candidato ao tratamento de infecções por HSV. No entanto, previamente à realização de ensaios antivirais, se faz necessário avaliar a citotoxicidade do composto frente às células utilizadas nos ensaios *in vitro* – visando garantir a segurança e a eficácia, determinar a concentração mais segura a ser utilizada, bem como facilitar a interpretação futura dos resultados dos ensaios antivirais.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultura Celular e Compostos

Foram utilizadas células da linhagem VERO ATCC1 1586 (células epiteliais renais extraídas de um macaco verde africano), uma vez que essas células são permissivas à infecção e replicação viral – o que será necessário para os ensaios antivirais. A manutenção foi realizada conforme protocolo previamente estabelecido no Laboratório de Virologia Aplicada (LAVi), da UFN. As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibióticos penicilina (100 U/mL)/estreptomicina (100 mg/mL), em garrafas de cultura celular. A incubação ocorreu em estufa a 37ºC, com atmosfera umidificada e 5% de CO_2. O repique e passagem das células foi realizado por meio da tripsinização.

O GO foi produzido utilizando o método de Hummer adaptado (Hummers; Offeman, 1958), no Laboratório de Nanociências da UFN, sendo composto por quatro etapas: oxidação, redução, nucleação e decantação. Após a produção do GO, procede-se à síntese do GO@Heparina, no mesmo laboratório, por meio do protocolo previamente estabelecido por Dos Santos *et al*. (2023), o qual consiste em três etapas: pré-tratamento, dissolução ou mistura de íons e secagem ou estabilização.

2.2 Ensaio de quantificação de DNA livre (DNA-PicoGreen®)

O ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA livre no meio foi realizado utilizando uma placa de 96 poços preta, na qual se adicionou TE 1x, seguido do sobrenadante da placa com tratamento. Por fim, o regente DNA-PicoGreen®, da marca Invitrogen (Life Technologies), foi adicionado e a placa foi incubada por 5 minutos. Neste período, ocorre a ligação do corante fluorescente a concentrações de DNA fita dupla (dsDNA). A leitura da fluorescência foi feita por espectrofluorímetro com 480 nm de excitação e 520 nm de emissão (HA *et al*., 2011).

O ensaio do PicoGreen®, como também é chamado, não avalia diretamente a citotoxicidade, porém, quantifica os ácidos nucleicos – em especial o dsDNA – presentes na amostra, gerando uma intensidade de fluorescência proporcional à quantidade de DNA presente. No contexto da avaliação de citotoxicidade, o ensaio

pode ser utilizado como um indicador indireto de morte celular, ou seja, quantificando o DNA extracelular liberado pelas células que sofreram morte celular em decorrência da exposição a um composto potencialmente tóxico. Logo, espera-se que células saudáveis – que não foram danificadas ou mortas devido ao tratamento – mantenham seus níveis de DNA, enquanto células danificadas ou mortas podem apresentar um redução na quantidade de DNA quantificável.

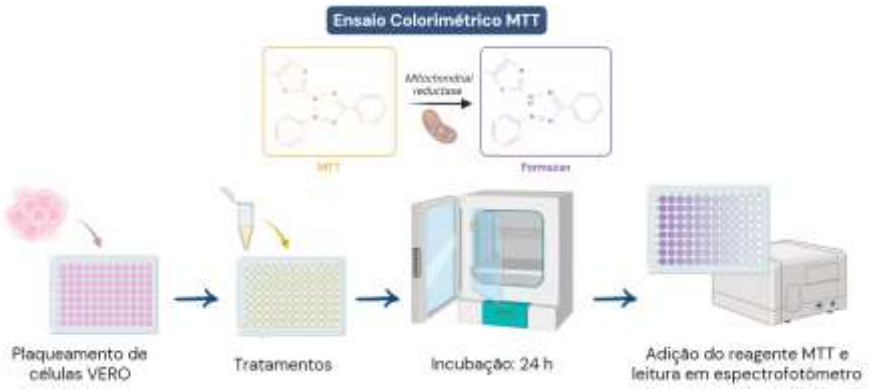
2.3 Ensaio colorimétrico MTT

A citotoxicidade do GO (isolado) e do GO@Heparina foi avaliada por meio do ensaio de viabilidade celular brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) – demonstrado pela Figura 1. O ensaio de MTT é um sistema colorimétrico que relaciona a atividade mitocondrial à viabilidade celular, sendo utilizado para screenning de citotoxicidade. O teste é baseado na capacidade das células viáveis em converter o sal MTT em um produto insolúvel, formazan, por meio de reações metabólicas intracelulares. A intensidade da cor formada está diretamente relacionada ao número de células viáveis presentes na cultura. Dessa forma, quanto maior a absorbância medida, maior a viabilidade celular (Van Meerloo; Kaspers; Cloos, 2011).

As células VERO previamente plaqueadas em microplacas de 96 poços foram expostas a diferentes concentrações de GO e GO@Heparina (5%, 10%, 25%, 50%, 75%), após diluição do composto em água, partindo do GO com 2,5% de heparina, e GO com 5% de heparina. Como controle de viabilidade celular, as células VERO foram incubadas apenas com DMEM 10% SFB, por 24h. Posteriormente, o sobrenadante das células foi descartado e procedeu uma etapa de lavagem com tampão fosfato, para remover possíveis interferentes.

Após, foi adicionado o reagente MTT, com posterior incubação por 1 hora a 37ºC – momento em que o reagente é reduzido e convertido ao composto formazan. Após a incubação e registro fotográfico, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado por poço, para solubilizar o formazan. A quantificação colorimétrica foi realizada por meio do espectrofotômetro leitor de microplaca, em um comprimento de onda de 560 nm. O valor da absorbância é proporcional ao número de células viáveis. A diferença do valor entre as absorbâncias foi utilizada para calcular a viabilidade celular.

Figura 1 – Metodologia do Ensaio Colorimétrico MTT.



Fonte: Construção do autor. Criado com: *biorender.com.*

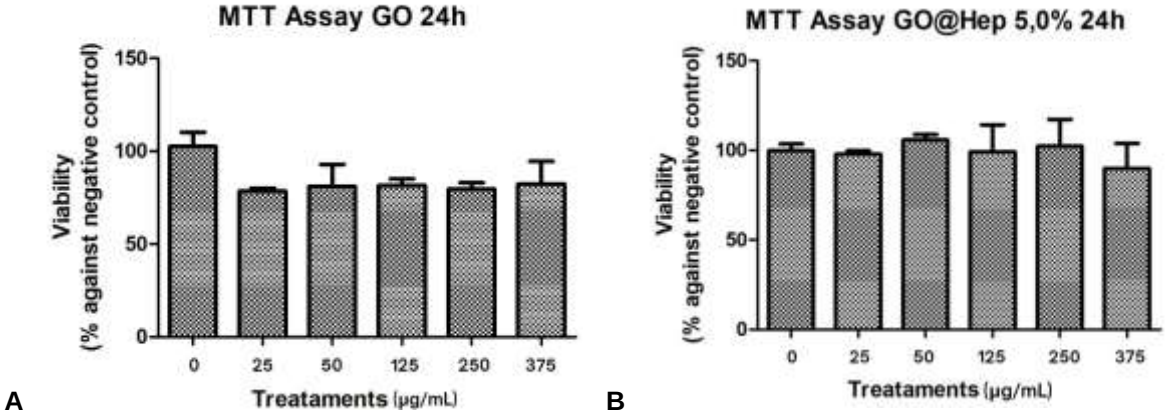
2.4 Análise estatística

Para análise estatística dos resultados foram utilizados dados de oito repetições independentes. A significância das amostras tratadas foram analisadas em relação aos valores obtidos para controle positivo dos testes. A significância entre os grupos que receberem tratamento e os controles foi realizada pelo teste de ANOVA com *post hoc de Dunnet*. Os dados foram trabalhados no *software* GraphPad Prism. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como representando uma diferença significativa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

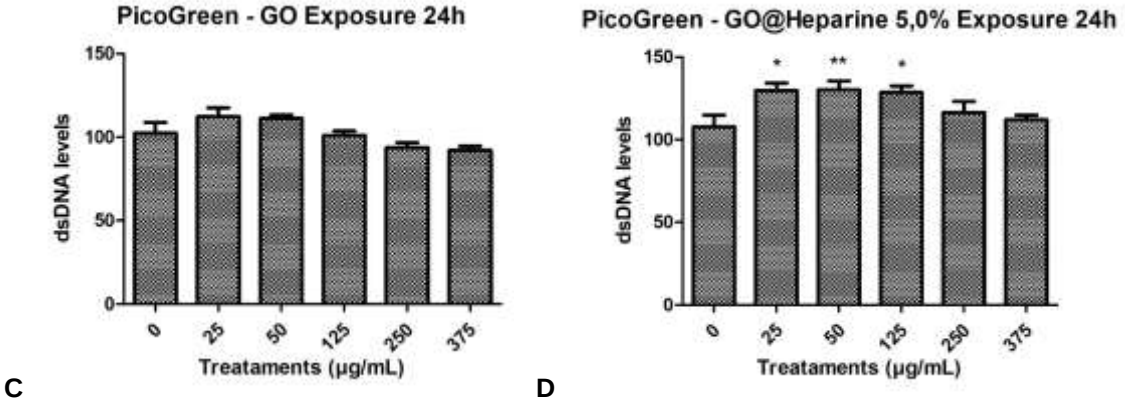
De acordo com os resultados obtidos em ambos os testes – representados pela Figura 2 e Figura 3 – , foi possível observar que, tanto o GO, quanto o GO@Heparina, não apresentaram citotoxicidade em células VERO, ao longo de 24 horas. Em relação ao GO@Heparina a 5% de heparina, o ensaio do PicoGreen® (D) demonstra um leve aumento dos níveis de dsDNA, conforme a dose do composto é aumentada (nas concentrações de 25, 50 e 125 µg/mL), sugerindo uma pequena redução na viabilidade celular. Contudo, esta redução não é confirmada pelo ensaio do MTT, que demonstra resultados preliminares promissores, sugerindo que ambos os compostos não possuem efeitos citotóxicos e não são capazes de influenciar, significativamente, a viabilidade celular, nas condições testadas.

Figura 2 – Ensaio Colorimétrico MTT.



Células VERO expostas a diferentes concentrações de GO (0; 25; 50; 125; 250; 375 µg/mL) (A) e GO@Hep 5,0 % (0; 25; 50; 125; 250; 375 µg/mL) (B), via Ensaio do MTT, durante 24 h. Fonte: Construção do autor.

Figura 3 – Ensaio PicoGreen®.



Células VERO expostas a diferentes concentrações de (0; 25; 50; 125; 250; 375 µg/mL) (C) e GO@Hep 5,0 % (0; 25; 50; 125; 250; 375 µg/mL) (D), via Ensaio PicoGreen®, durante 24 h. Fonte: Construção do autor.

Em relação ao GO, foi possível perceber que o composto também não apresentou toxicidade às células VERO. Contudo, tal resultado não corrobora com o esperado, e também apresentado por Ghazimoradi *et al*. (2022), que retrata diversos estudos nos quais GO causou citotoxicidade e apoptose em linhagem celulares humanas derivadas de feocromocitoma neural (PC12), em concentrações de 50 a 100 µg/mL, com exposição também por 24 h. De acordo com o autor, vários são os

mecanismos celulares prováveis para a toxicidade do GO, entre eles os danos mitocondriais, danos ao DNA, interrupção de cascadas inflamatórias, distúrbios metabólicos e geração de espécies reativas de oxigênio.

De acordo com Zhang *et al.* (2022), as nanopartículas de óxido de grafeno possuem o potencial de produzir efeitos citotóxicos, porém, estes estão relacionados ao seu tamanho, concentração, tempo, forma e tipo de célula. Diante disso, uma das possibilidades que justifica a ausência de toxicidade são as concentrações utilizadas, bem como o tempo relativamente curto de exposição das células ao composto. Considerando que o período de incubação das células com o composto foi de apenas 24 horas, é possível que os efeitos citotóxicos – se existentes – não tenham tido tempo suficiente para se manifestar. Além disso, é possível que efeitos tóxicos sejam induzidos com concentrações mais elevadas do composto.

Além disso, apesar de não apresentar diferença estatística significativa, é possível observar uma discreta diferença entre a viabilidade celular das células tratadas com GO@Heparina (B), e as células tratadas apenas com GO (A), indicando menor citotoxicidade do GO funcionalizado à heparina. Diante disso, é sugestivo de que a heparina apresente um efeito citoprotetor diante das células expostas. Tal proteção é relatada na literatura, por Tsai *et al.* (2018), que descreveu a heparina como responsável por um aumento na viabilidade celular de células bEND.3 tratadas com um bioativo do LDL oxidado – a lisofosfatidilcolina (LPC).

4. CONCLUSÃO

Os testes de citotoxicidade, a exemplo do MTT e PicoGreen®, possuem papel importante nas etapas preliminares do perfil de segurança de um composto, antes de avançar para testes mais específicos, como os antivirais. É fundamental garantir que os compostos estudados não causem danos às células testadas.

Este estudo permitiu concluir que os compostos GO e GO@Heparina 5% não apresentaram citotoxicidade após 24 horas de exposição, o que sugere uma margem de segurança ideal para sua aplicação. Visando confirmar a segurança dos compostos, se faz necessário realizar ensaios adicionais com períodos de exposição mais longos (como 48 e 72 horas), visando confirmar a segurança do composto para futuros ensaios de atividade anti-herpética.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), nº 24/2551-0000601-0.

REFERÊNCIAS

ATALLAH, J. *et al*. The use of heparin and heparin-like molecules in cancer treatment: a review. **Cancer Treatment and Research Communications**, v. 24, p. 100192, 2020.

COHEN, J. I. Herpesvirus latency. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 7, p. 3361–3369, 1 jul. 2020.

DOS SANTOS, A. F. *et al*. Evaluation interaction of graphene oxide with heparin for antiviral blockade: a study of ab initio simulations, molecular *docking*, and experimental analysis. **Journal of Molecular Modeling**, v. 29, n. 8, p. 235, 7 jul. 2023.

GHAZIMORADI, M. M. *et al*. Epigenetic effects of graphene oxide and its derivatives: A mini-review. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 878, p. 503483, 1 jun. 2022.

HUMMERS, W. S. JR.; OFFEMAN, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 6, p. 1339–1339, 1 mar. 1958.

HA, Tran Thi Ngoc *et al*. Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. 1–7, 2011.

MENEGHETTI, M. C. Z. *et al*. Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 12, n. 110, p. 20150589, set. 2015.

MYCROFT-WEST, C. *et al*. The 2019 coronavirus (SARS-CoV-2) surface protein (Spike) S1 Receptor Binding Domain undergoes conformational change upon heparin binding. **BioRxiv.** 29 abr. 2020.

OLIVEIRA, A. M. L. *et al*. Graphene Oxide Thin Films with Drug Delivery Function. **Nanomaterials**, v. 12, n. 7, p. 1149, 30 mar. 2022.

TODOSENKO, N. *et al*. Heparin and Heparin-Based Drug Delivery Systems: Pleiotropic Molecular Effects at Multiple Drug Resistance of Osteosarcoma and Immune Cells. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 10, p. 2181, 13 out. 2022.

TSAI, T.-Y. *et al*. Lysophosphatidylcholine-induced cytotoxicity and protection by heparin in mouse brain bEND.3 endothelial cells. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 1, p. 52–62, 2019.

VAN MEERLOO, Johan; KASPERS, Gertjan J. L.; CLOOS, Jacqueline. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: Cree, Ian A. (Ed.). **Cancer Cell Culture**. New York: Springer, 2011.

WU, S.-Y.; AN, S. S. A.; HULME, J. Current applications of graphene oxide in nanomedicine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, n. Spec Iss, p. 9–24, 26 ago. 2015.

XIONG, S. *et al*. Targeted graphene oxide for drug delivery as a therapeutic nanoplatform against Parkinson’s disease. **Biomaterials Science**, v. 9, n. 5, p. 1705–1715, 2021.

ZHANG, Y. *et al*. Cytotoxicity Effect of Iron Oxide (Fe3O4)/Graphene Oxide (GO) Nanosheets in Cultured HBE Cells. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, p. 888033, 9 maio 2022.