

Documento informativo del caso

Delitos

- Homicidio corporativo involuntario
- Homicidio culposo grave

Se requiere una acción inmediata:

Detener el despliegue de los tratamientos experimentales conocidos como "vacunas COVID-19 " de forma inmediata a la espera del examen forense de la Policía.

Identificación de los Demandados

- AstraZéneca
- Pfizer
- Moderna
- Servicio Nacional de Salud (NHS)
- Agencia Reguladora de Medicamentos y Productos Saniatrios (MHRA)
- Copmité Mixto de Vacunación e Inmunización (JCVI)
- El Gobierno de Su Majestad

Declaración de Antecedentes

El Gobierno británico inició a principios de 2021 el despliegue de lo que ahora se denomina "vacunas COVID-19. Dichas "vacunas" recibieron una Autorización de Emergencia temporal en virtud de la Regulación 174 de la Ley de Regulación de Medicamentos Humanos (2012).

Todos los ensayos de fase 3 de la vacuna COVID-19 están en curso y no concluirán hasta finales de 2022 o principios de 2023. Los tratamientos son actualmente experimentales, con sólo un año de datos a corto plazo y sin datos de seguridad a largo plazo en humanos. Actualmente se acepta ampliamente que ninguno de los tratamientos experimentales de COVID-19 prohíbe la infección de COVID-19 ni la transmisión de ninguna enfermedad.

Científicos de todo el mundo han informado de hallazgos inusuales al examinar el contenido de los viales de inyección de COVID-19, en un esfuerzo por determinar qué está causando las muertes, lesiones y reacciones adversas notificadas.

El 20 de septiembre de 2021, en el instituto patológico de Reutlingen (Alemania), se presentaron los resultados de las autopsias de ocho personas fallecidas tras el tratamiento experimental con COVID19. Los análisis de tejidos finos fueron realizados por los patólogos Prof. Dr. Arne Burkhardt y Prof. Dr. Walter Lang. Los resultados confirman el informe anterior del Prof. Dr. Peter Schirmacher. De los más de 40 cadáveres a los que realizó la autopsia, que habían muerto en las dos semanas siguientes al tratamiento experimental con COVID19, aproximadamente un tercio de esas muertes fueron causadas por el propio tratamiento experimental.

En noviembre de 2020, el Dr. Andreas Noack, químico alemán y uno de los mayores expertos en grafeno de la UE, publicó un vídeo en el que explicaba que había descubierto el hidróxido de grafeno contenido en los tratamientos experimentales COVID-19. Describió cómo las nanoestructuras de hidróxido de grafeno inyectadas en el cuerpo humano actúan como "cuchillas de afeitar" dentro de las venas de los receptores y cómo no aparecerían en una autopsia o en las pruebas toxicológicas normales dado su tamaño atómico.

El 26 de noviembre de 2021, apenas unas horas después de publicar su último vídeo sobre el hidróxido de grafeno, murió en circunstancias sospechosas.

El profesor Dr. Pablo Campra, de la Universidad de Almería (España), también examinó los tratamientos experimentales de Covid-19 en noviembre de 2021 utilizando la espectroscopia Micro-Raman, el estudio de las frecuencias. Él también confirmó la presencia de grafeno.

Informes de muertes y lesiones posteriores a la vacunación

Es posible remitirle a numerosos informes sobre muertes y lesiones realizados mediante declaraciones a la policía y a los abogados en todo el Reino Unido.

El personal médico del Reino Unido tiene la obligación de notificar cualquier lesión, reacción adversa o muerte tras la inyección de estos tratamientos experimentales. La MHRA (Agencia Reguladora de Medicamentos y Productos Sanitarios) creó el Sistema de Tarjeta Amarilla con este fin y fomenta la notificación de sospechas de efectos secundarios de COVID-19 a medicamentos y vacunas o dispositivos médicos e incidentes adversos de diagnóstico utilizados en el tratamiento con coronavirus.

Hasta el 5 de enero de 2022, este sistema muestra que la muerte ha sido listada como un resultado relacionado con los tratamientos experimentales de COVID-19 al menos 1.932 veces, así como casi un millón y medio de reacciones adversas a los tratamientos experimentales (1.414.293). En los Estados Unidos, los informes del VAERS (Sistema de Notificación de Eventos Adversos a las Vacunas) de Muertes han sido listados como un resultado relacionado con los tratamientos experimentales de COVID-19 al menos 21.745 veces a partir del 7 de enero de 2022 y 38.000 personas están permanentemente discapacitadas.

En la base de datos europea Euro eudraVigilance, la muerte ha sido listada como un resultado relacionado con los tratamientos experimentales de COVID-19 al menos 34.337 veces hasta el 18 de diciembre de 2021. También se han notificado 3,1 millones de lesiones.

De ello se deduce que las tasas de aumento de la muerte y de los daños significativos están aumentando a medida que se desarrolla el programa de tratamiento experimental.

Investigación

A raíz de su propia experiencia con pacientes que habían sufrido aparentes lesiones y reacciones adversas a la vacuna, una médica británica se presentó en diciembre de 2021 ofreciéndose a colaborar en una investigación para determinar si los resultados descubiertos por los doctores Noack y Campra podían reproducirse en el Reino Unido y también para examinar los viales de inyección de COVID-19 en busca de toxinas o contenidos inesperados.

La doctora se apoderó de un vial de inyección de la nevera de la consulta en la que trabaja y lo entregó a un investigador independiente que colabora en la investigación de casos relacionados con lesiones sufridas como consecuencia de las inyecciones administradas en el marco de la implantación.

Desde entonces se han obtenido más viales que cubren los tres principales fabricantes del Reino Unido: Pfizer, Moderna y AstraZeneca.

El contenido de los frascos de inyección ha sido examinado forzosamente y se adjunta a este escrito un informe de laboratorio. A continuación se presenta un resumen de los resultados.

A continuación se incluye un breve resumen del informe toxicológico, cuyo documento completo se adjunta.

Se espera un artículo científico completo revisado por pares a su debido tiempo. Tan pronto como tuvimos la confirmación del informe del laboratorio y la toxicología. Ian Clayton se puso en contacto con la Policía (detalles) de acuerdo con el deber de atención al público para solicitar el cese inmediato del despliegue del tratamiento experimental y para concertar una cita para presentar estas pruebas en persona a la Policía.

Cadena de Pruebas

1. Vial inyectable entregado en la consulta del médico de cabecera
2. Vial inyectable recogido en el frigorífico de la consulta del médico de cabecera
3. Entrega del Vial inyectable al equipo de investigación
4. Vial inyectable entregado al laboratorio
5. Vial inyectable examinado forzosamente
6. Vial inyectable retenido para fines de divulgación

Anexos

Se adjuntan los siguientes documentos en respaldo de esta exposición:

- Informe de Laboratorio
- Artículo científico "Toxicidad de nano partículas de la familia del grafeno: revisión de los orígenes y mecanismos"
- Resumen de Layman del artículo "Toxicidad de nano partículas de la familia del grafeno: revisión de los orígenes y mecanismos"

Resumen del informe del laboratorio

A continuación se resumen los resultados detallados en el informe de calidad garantizada

adjunto: La espectroscopia RAMAN descubrió las siguientes partículas -

- Grafeno
- Carbono SP3
- Óxido de hierro
- Derivados del carbono

Resumen del informe toxicológico

El resumen de los hallazgos detallados en el informe toxicológico adjunto es el siguiente:

- Los nanomateriales de grafeno (GFN) pueden penetrar las barreras naturales del cuerpo y dañar el sistema nervioso central:
 - a. puede dañar los órganos internos
 - b. daña el sistema de reproducción y desarrollo
 - c. destruye la salud de la sangre
 - d. daña y destruye las células
 - e. puede desencadenar el cáncer y acelerar el envejecimiento
 - f. daña las mitocondrias y el ADN
 - g. desencadena una respuesta inflamatoria y tres tipos diferentes de muerte celular
 - h. provoca cambios en la función de los genes

Presentación a la policía

Con la información que se le ha facilitado hoy hay sospechas más que razonables de que se han cometido graves delitos perseguibles.

También hay motivos más que suficientes para que la policía solicite una orden de arresto según el artículo 8 de la Ley de Pruebas Policiales y Criminales de 1984 y se incaute de los viales de las inyecciones y los envíe a un laboratorio del Ministerio del Interior con el fin de replicar nuestros hallazgos.

Una vez reproducidos los exámenes, la Policía dispondrá de sus propias pruebas fehacientes para respaldar delitos graves.

El primer y principal deber de la Policía es la protección de la vida. Por lo tanto, corresponde a la Policía tomar medidas para detener el despliegue de estos tratamientos experimentales inmediatamente y hasta que sus propias investigaciones forenses hayan concluido. Una vez más, hay motivos razonables para hacerlo.

A los principales acusados potenciales en este asunto, según la lista anterior, se les impide llevar a cabo cualquier investigación por sí mismos. Se trata de un asunto que corresponde únicamente a la Policía.

Ian Clayton es cofundador de un colectivo de personas llamado UKCitizen2021, creado a su vez por un pequeño grupo de personas que anteriormente trabajaban en la profesión jurídica. Él es la persona que le informa de este asunto y es su punto de contacto en adelante.

Durante su participación en UKCitizen2021, Ian Clayton ha acumulado una gran cantidad de contactos, información y acceso directo a diversos expertos en muchos campos. Está más que dispuesto a ayudar y orientar a la Policía.

Dado que la Policía tiene el deber de realizar las pruebas forenses necesarias por sí misma, no es necesario mencionar los nombres de las personas implicadas en este asunto. Debido al hecho de que el Dr. Noack murió en circunstancias sospechosas tras su publicación de un vídeo sobre la presencia de hidróxido de grafeno; las identidades de las personas implicadas en esta investigación forense privada se mantienen en secreto por razones de seguridad.

Ley de Homicidio Corporativo de 2007
Actos públicos generales del Reino Unido

<<https://www.legislation.gov.uk/ukpga/2007/19/contents>>

1 El delito

(1) Una organización a la que se aplica este artículo es culpable de un delito si el modo en que se gestionan u organizan sus actividades

(a) causa la muerte de una persona, y

(b) supone un incumplimiento grave de una obligación de atención relevante que la organización debe tener con el fallecido.

(2) Las organizaciones a las que se aplica este artículo son

(a) una corporación;

(b) un departamento u otro organismo enumerado en el anexo 1;

(c) un cuerpo de policía;

(d) una sociedad, o un sindicato o asociación de empresarios, que sea un empleador.

(3) Una organización es culpable de un delito en virtud de esta sección sólo si la forma en que sus actividades son gestionadas u organizadas por su alta dirección es un elemento sustancial en la infracción mencionada en la subsección (1).

(4) A los efectos de esta Ley

(a) "deber de diligencia pertinente" tiene el significado que le da el artículo 2, leído con los artículos 3 a 7;

(b) el incumplimiento de un deber de diligencia por parte de una organización es un incumplimiento "grave" si la conducta que se alega como incumplimiento de dicho deber está muy por debajo de lo que razonablemente se puede esperar de la organización en las circunstancias;

(c) "alta dirección", en relación con una organización, significa las personas que desempeñan un papel significativo en la toma de decisiones sobre la forma de gestionar u organizar la totalidad o una parte sustancial de sus actividades, o la gestión u organización efectiva de la totalidad o de una parte sustancial de dichas actividades.

(5) El delito previsto en este artículo se denomina

(a) homicidio de empresa, en la medida en que sea un delito según la legislación de Inglaterra y Gales o de Irlanda del Norte;

(b) homicidio de empresa, en la medida en que sea un delito según la legislación de Escocia.

(6) Una organización culpable de homicidio de empresa o de homicidio de empresa puede ser condenada a una multa.

(7) El delito de homicidio de empresa sólo es procesable en el Tribunal Superior de Justicia

Homicidio culposo grave

La Ley

Los ingredientes del delito se expusieron con autoridad en el destacado caso R v Adomako [1995] 1 AC 171 en el que Lord Mackay de Clashfern LC, en la página 187, dijo lo siguiente "En mi opinión, la ley tal y como se establece en estas dos autoridades Bateman (1925) 19 Cr. App. R. 8 y Andrews v DPP [1937] AC 576 es satisfactoria ya que proporciona una base adecuada para describir el delito de homicidio involuntario. Dado que la decisión en Andrews fue una decisión de la casa de sus Señorías, sigue siendo la declaración más autorizada de la ley actual que he podido encontrar y no se ha apartado de ella. Sobre esta base, en mi opinión se aplican los principios ordinarios de la negligencia para determinar si el demandado ha incumplido o no un deber de cuidado hacia la víctima que ha fallecido. Si se establece tal incumplimiento del deber, la siguiente cuestión es si ese incumplimiento del deber causó la muerte de la víctima. En caso afirmativo, el jurado debe pasar a considerar si ese incumplimiento del deber debe calificarse de negligencia grave y, por tanto, de delito".

Por lo tanto, para probar el delito, la acusación debe establecer los siguientes elementos:

- a) El acusado tenía un deber de cuidado hacia el fallecido;
- b) Mediante un acto u omisión negligente, el acusado incumplió el deber que tenía para con el fallecido;
- c) La acción u omisión negligente fue la causa de la muerte; y
- d) La negligencia, que fue una causa de la muerte, equivale a una negligencia grave y, por lo tanto, es un delito; Más recientemente, los elementos del homicidio por negligencia grave fueron expuestos de forma concisa por el Presidente de la Queen's Bench Division en R v Rudling [2016] EWCA Crim 741 en el párrafo 18 como sigue:

Podemos resumir la ley en breve. Los ingredientes críticos del homicidio por negligencia grave pueden extraerse de R v Prentice, Adomako y Holloway [1994] QB 302 en este tribunal y Adomako [1995] 1 AC 171, [1994] 99 Crim App R 362 en la Cámara de los Lores, así como R v Misra [2005] 1 Cr App R 21. Pueden resumirse como el incumplimiento de un deber de cuidado existente que es razonablemente previsible que da lugar a un riesgo grave y evidente de muerte y que, de hecho, causa la muerte en circunstancias en las que, teniendo en cuenta el riesgo de muerte, la conducta del acusado fue tan mala en todas las circunstancias que equivale a una acción u omisión delictiva (véase Adomako [2005] 1 Cr App Rep en 369). La Cámara de los Lores estableció los elementos de la GNM en R v Adomako [1995] 1 AC 171.

Otros Delitos

De ello se desprende que otros numerosos delitos habrán sido cometidos por otros individuos que no pretendo detallar aquí pero que la Policía tendrá en cuenta a su debido tiempo.

Ley de Policía y Pruebas Penales de 1984

Actos públicos generales del Reino Unido

<<https://www.legislation.gov.uk/ukpga/1984/c.60>>

<<https://www.legislation.gov.uk/ukpga/1984/60/contents>> Part II

<<https://www.legislation.gov.uk/ukpga/1984/60/part/II>> Ley de Policía y Pruebas Penales de 1984

Órdenes de búsqueda

Poder del juez de paz para autorizar la entrada y el registro de locales.

(1) Si, a petición de un agente de policía, un juez de paz está convencido de que existen motivos razonables para creer

- (a) que se ha cometido un delito grave; y
- (b) que existe material en los locales mencionados en el apartado (1A) que puede tener un valor sustancial (por sí mismo o junto con otro material) para la investigación del delito; y
- (c) que es probable que el material sea una prueba relevante; y
- (d) que no consiste o incluye elementos sujetos a privilegio legal, material excluido o material de procedimiento especial; y
- (e) que se cumple alguna de las condiciones especificadas en el apartado (3) siguiente,

podrá expedir una orden que autorice a un agente a entrar y registrar los locales en relación con cada conjunto de locales especificados en la solicitud.(1A)

(1A) Los locales a los que se refiere la subsección (1)(b) anterior son

- (a) uno o más conjuntos de locales especificados en la solicitud (en cuyo caso la solicitud es para una "orden de registro de locales específicos"); o
- (b) cualquier local ocupado o controlado por una persona especificada en la solicitud, incluyendo los conjuntos de locales especificados (en cuyo caso la solicitud es para una "orden de todos los locales").

(1B) Si la solicitud es para una orden de registro de todos los locales, el juez de paz también debe estar convencido de que

- (a) que, debido a los detalles del delito mencionado en el párrafo (a) del apartado (1) anterior, existen motivos razonables para creer que es necesario registrar los locales ocupados o controlados por la persona en cuestión que no se especifican en la solicitud para encontrar el material mencionado en el párrafo (b) de dicho apartado; y
- (b) que no es razonablemente factible especificar en la solicitud todos los locales que ocupa o controla y que podrían tener que ser registrados.

(1C) El exhorto puede autorizar la entrada y el registro de los locales en más de una ocasión si, tras la solicitud, el juez de paz está convencido de que es necesario autorizar múltiples entradas para lograr el objetivo para el que expide el exhorto.

(1D) Si autoriza entradas múltiples, el número de entradas autorizadas puede ser ilimitado o limitado a un máximo.

(2) Un agente puede incautar y retener cualquier cosa para la que se haya autorizado un registro en virtud del subapartado anterior.

(3) Las condiciones mencionadas en la subsección (1)(e) anterior son

- (a) que no sea posible comunicarse con ninguna persona con derecho a conceder la entrada a los locales;
- (b) que sea posible comunicarse con una persona con derecho a conceder la entrada a los locales, pero que no sea posible comunicarse con ninguna persona con derecho a conceder el acceso a las pruebas;
- (c) que no se concederá la entrada a los locales a menos que se presente una orden judicial;
- (d) que el propósito de un registro puede verse frustrado o gravemente perjudicado a menos que un agente que llegue a los locales pueda garantizar la entrada inmediata a los mismos.

(4) En la presente ley, se entiende por "pruebas pertinentes", en relación con un delito, todo lo que sería admisible como prueba en un juicio por el delito.

(5) La facultad de emitir una orden judicial conferida por este artículo se suma a cualquier otra facultad conferida de otro modo.

(6) Este artículo se aplica en relación con un delito relevante, tal y como se define en el artículo 28 de la Ley de Inmigración de 1971, del mismo modo que se aplica en relación con un delito enjuiciable.

(7) El artículo 4 de la Ley de Jurisdicción Sumaria (Proceso) de 1881 (ejecución del proceso de los tribunales ingleses en Escocia) se aplicará a una orden dictada a petición de un funcionario de Hacienda en virtud de este artículo en virtud del artículo 114 siguiente. Home Office Guidelines on the Reporting and Recording of Crime

Directrices del Ministerio del Interior sobre la denuncia y el registro de delitos

La Ley

El artículo 44 (2 y 3) de la Ley de Policía de 1996 establece que el Ministro del Interior puede exigir a los jefes de policía de las fuerzas de Inglaterra y Gales que faciliten datos estadísticos.

El HOOCR también promueve un enfoque orientado a las víctimas (documento PDF)

https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/387762/count-vision-december-2014.pdf para el registro de los delitos. Esto significa que la creencia de la víctima de que se ha producido un delito es, en la mayoría de los casos, suficiente para justificar su registro como delito.

El proceso de registro de delitos utilizado por la policía puede dividirse en seis etapas, que se exponen a continuación.

1. Notificación y registro de incidentes

Los incidentes notificados a la policía están relacionados con cuestiones como la seguridad y el bienestar públicos, la delincuencia, el comportamiento antisocial

<https://www.justiceinspectorates.gov.uk/hmicfrs/glossary/anti-social-behaviour/> y el transporte.

Hay muchas maneras de notificar incidentes a la policía:

-las víctimas <https://www.justiceinspectorates.gov.uk/hmicfrs/glossary/victims/>, los testigos u otros terceros pueden informar a un agente de policía, a un PCSO o a un miembro del personal, ya sea en la calle o en el mostrador de una comisaría;

-las víctimas <https://www.justiceinspectorates.gov.uk/hmicfrs/glossary/victims/>, los testigos u otros terceros pueden llamar por teléfono a las salas de control de la policía;

-las víctimas <https://www.justiceinspectorates.gov.uk/hmicfrs/glossary/victims/>, los testigos u otros terceros pueden denunciar un incidente en línea;

-la policía puede descubrir el delito por sí misma; o

-otros organismos, como los servicios sociales, pueden remitirlos. También es posible que otros organismos remitan un incidente que es claramente un delito.

Las HOOCR exigen que "todas las denuncias de incidentes, ya sean de víctimas

<https://www.justiceinspectorates.gov.uk/hmicfrs/glossary/victims/>, testigos o terceros y estén o no relacionados con un delito, darán lugar al registro de un informe de incidente por parte de la policía".

Continúa especificando que estos deben registrarse en un sistema auditable, lo que en la práctica significa:

-un registro de incidentes (a veces denominado registro de mando y control); y/o, -un registro en el sistema de delitos de la fuerza.

Al registrar un incidente, el personal asigna un "código de apertura" al registro de incidentes. Los códigos de apertura indican la naturaleza del incidente, por ejemplo, si se trata de un accidente de tráfico o de un robo. Los códigos de apertura son importantes porque permiten a los supervisores ver inmediatamente qué tipo de incidentes están abiertos en ese momento y priorizar los recursos en consecuencia.

2. Decidir si un delito debe ser registrado

Las HOCR exigen:

"Un incidente se registrará como delito (infracción notificable)

1. En el caso de los delitos contra una víctima identificada si, según el balance de probabilidades:
-Las circunstancias denunciadas son constitutivas de un delito tipificado por la ley (la policía lo determinará, basándose en su conocimiento de la ley y de las normas de cómputo), y -No existen pruebas creíbles de lo contrario.

2. En el caso de los delitos contra el Estado, antes de registrar un delito, deben quedar claramente establecidos los puntos que deben probarse para evidenciar el delito".
Dado que las normas obligan a la policía a aceptar lo que dice la víctima a menos que haya "pruebas creíbles de lo contrario", las siguientes razones no son suficientes para justificar que no se registre un delito

- la víctima se niega a dar detalles personales;
- la víctima no quiere llevar el asunto más allá; o
- la acusación no puede ser probada.

En relación con la prueba de equilibrio de probabilidades, la Norma Nacional de Registro de Delitos (que se reproduce en el anexo A del HOCR (documento PDF)

<https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/534967/count-general-july-2016.pdf_.pdf>) señala que:

En la mayoría de los casos, la creencia de la víctima (o de la persona que razonablemente se supone que actúa en nombre de la víctima) de que se ha producido un delito es suficiente para justificar su registro como delito, aunque no será así en todas las circunstancias. Efectivamente, se aboga por un enfoque más orientado a la víctima".

"Una denuncia debe considerarse como hecha, en el primer punto de contacto, es decir, la etapa en la que la víctima o una persona que razonablemente se supone que actúa en nombre de la víctima se pone en contacto por primera vez con la policía, ya sea por teléfono, etc. o en persona. Si no se puede contactar con una presunta o posible víctima o ésta se niega posteriormente a proporcionar más detalles, el proceso de toma de decisiones sobre el registro de delitos (CRDMP) debe basarse en toda la información disponible sobre el primer contacto".

CGC-IDS

Proyecto CUNIT-2-112Y6580

Evaluación cualitativa de Inclusiones
en vacunas Covid-19 de
Moderna, AstraZeneca y Pfizer

Intelligence Defence & Security

Por
UNIT



UNIT



Global Humanitarian Crisis Prevention and Response Unit

Resumen Ejecutivo

UNIT recibió el encargo de EbMCsquared CiC, en el marco del proyecto UNITC-112980, de investigar el contenido de cuatro viales de inyección (Moderna 01, Moderna 02, AstraZeneca, Pfizer) para detectar cualquier ingrediente no declarado que pudiera causar daños corporales.

Este informe es la presentación de los resultados iniciales que confirman la presencia de compuestos de grafeno en cada uno de los viales de inyección. Aunque no se ha establecido una estimación cuantitativa de la concentración de grafeno en las muestras, su presencia se encuentra en un rango de alta frecuencia en un transecto medio de 2 cm cuando los recuentos se realizaron con un aumento mayor (40x).

UNIT

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Introducción	5
1.1. Antecedentes	5
1.2. Descripción de los Viales	5
1.3. Objetivos del Estudio	6
1.4. Estructura y Esquema del Estudio	6
2. Metodología	8
2.1. Descripción de los Viales	8
2.2. Proceso de muestreo y preparación de portaobjetos	8
2.3. Espectrografía Raman	10
3. Resultados	11
3.1. Descripción de las Inclusiones	11
3.1.1. Compuestos de Grafeno en forma de Nanocintas	11
3.1.2. Compuesto de Grafeno Forma 1	12
3.1.3. Compuesto de Grafeno Forma 2	12
3.1.4. Calcita	13
3.1.5. Nano Formas de Grafeno	13
3.1.6. Formas Cristalizadas de la Solución	14
3.2. Moderna 01	15
3.2.1. Microscopía	15
3.2.2. Investigación Espectrografía Raman	18
3.2.3. Recuento	20
3.3. Moderna 02	21
3.3.1. Microscopía	21
3.3.2. Investigación Espectrografía Raman	25
3.2.3. Recuento	26
3.4. AstraZeneca	28
3.4.1. Microscopía	28
3.4.2. Investigación Espectrografía Raman	32
3.4.3. Recuento	34
3.5. Pfizer	35
3.5.1. Microscopía	35
3.5.2. Investigación Espectrografía Raman	38
3.5.3. Recuento	39
4. Interpretación, Discusión y Conclusión	41
5. Bibliografía	45



Global Humanitarian Crisis Prevention and Response UnitGlobal Humanitarian Crisis Prevention and Response Unit

**ESTE INFORME Y CUALQUIERA DE SUS CONTENIDOS
MARCADOS CON LA ETIQUETA DE IDENTIDAD
AUC101 SON EstrictAMENTE CONFIDENCIALES.**

**QUEDA EstrictAMENTE PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN
O DISTRIBUCIÓN NO AUTORIZADA DE ESTE INFORME.**

Intelligence Defence & Security

Cualquier consulta sobre reproducción y distribución debe dirigirse

a
UNIT

En
info@openplatform.uk

DESCARGO DE RESPONSABILIDAD

Este trabajo es un informe provisional con la presentación de los resultados iniciales de los análisis de laboratorio del proyecto UNITC-112980.

Se está trabajando para analizar y procesar críticamente estos resultados iniciales y elaborar un informe analítico y cuantitativo más profundo.

UNIT no se hace responsable de las interpretaciones que hagan los lectores del informe.



1. Introducción

El siguiente informe es el resultado de la cooperación entre EbMCsquared CiC y UNIT en un intento de identificar los contenidos no declarados de las vacunas actuales que se administran al público del Reino Unido y que causan un elevado número de reacciones adversas y muertes.

1.1. Antecedentes

UNIT recibió el encargo de EbMCsquared en el marco de UNITC-112980 para analizar el contenido de cuatro viales de vacunas e identificar si alguno de los siguientes componentes estaba presente en estos viales

- grafeno, óxido de grafeno, parásitos, filamentos biológicos.

Las cuatro vacunas objeto de esta primera investigación de UNIT pertenecían a Moderna, Pfizer y AstraZeneca.

El proceso completo de recogida y entrega se recoge en el ANEXO 1A.

1.2. Descripción de los Viales

1.2.1. Etiquetaje de Moderna 01

La etiqueta de fabricación tenía la siguiente información en el vial:

COVID-19 Vacuna Moderna. 020mg/mL Dispersión para inyección. Vacuna COVID-19 ARNm (modificada con nucleósidos) Dosis de vial multidosis de .5mL. Lote-3004737 Exp. 24/01/2022.

El líquido contenido en el frasco de Moderna era turbio a simple vista contra la luz del sol.

1.2.2. Etiquetaje de Moderna 02

La etiqueta de fabricación tenía la siguiente información en el frasco:

COVID-19 Vacuna Moderna. 020mg/mL Dispersión para inyección. Vacuna COVID-19 ARNm (modificada con nucleósidos) Dosis de vial multidosis de .5mL. Lote- Lote-3004737 Exp. 24/01/2022.

El peso del frasco antes de romper el precinto era de 18,842gm.

El líquido contenido en el frasco de Moderna era turbio a simple vista contra la luz del sol.

1.2.3. Etiquetado de AstraZéneca

La etiqueta de fabricación tenía la siguiente información en el vial:



Global Humanitarian Crisis Prevention and Response Unit

Vacuna Covid-19 4 ml, Astrazéneca Inyección. Vacuna Covid-19: (ChAd0x1-S (recombinante)), uso intramuscular. Vial multidosis (8x0,5ml dosis). 108439/2 Lote-PW40167 Caducidad- 01-22. (Figura 2.1)

El peso del frasco antes de la rotura del precinto era de 12,184g y después de la rotura del precinto era de 11,803g.

El líquido contenido en el frasco de AstraZéneca era transparente a simple vista.

1.2.4. Etiquetado de Pfizer

La etiqueta de fabricación tenía la siguiente información en el vial figura 1.1:



Figure 1.1. Pfizer vaccine vial

Lot-FC9001 Exp. 09/01/2022.

El líquido contenido en el frasco de AstraZéneca era turbio a simple vista a la luz del sol.

1.3. Objetivos del estudio.

El objetivo del estudio era identificar cualquier inclusión sólida en los viales que no hubiera sido declarada por los fabricantes.

El estudio debía verificar los hallazgos de compuestos relacionados con el grafeno, como el óxido de grafeno y el hidróxido de grafeno, realizados por Campra (2021), e informar sobre cualquier otra inclusión biológica que pudiera interpretarse como tóxica para el cuerpo humano.

1.4. Estructura y Esquema del informe.

Los frascos pasaron por la evaluación del contenido en cuatro sitios de laboratorio diferentes que se identifican en el ANEXO 1B bajo requerimiento y la metodología adoptada se presenta en el capítulo dos.



Global Humanitarian Crisis Prevention and Response Unit

El informe presenta un análisis en profundidad de los resultados de este proyecto y está dividido en cinco capítulos. El capítulo uno es la introducción, el segundo es una descripción y análisis de los métodos utilizados para la evaluación. El capítulo tres presenta los resultados del análisis, el capítulo cuatro es la interpretación, las discusiones y las conclusiones del estudio. La bibliografía constituye el último capítulo del informe. Todo el proyecto ha contado con las aportaciones de expertos en distintos campos y sus nombres, afiliaciones y conocimientos se identifican a efectos de referencia en el Anexo 2.

Intelligence Defence & Security



UNIT



2. Metodología

2.1. Descripción de los Viales

Los frascos sellados eran de vidrio y las vacunas contenidas en ellos estaban en forma líquida. Las diferentes partes del vial se muestran en la figura 2.1. Cada uno de estos viales se almacenó a 4°C en las salas de almacenamiento de muestras hasta que tuvo lugar la evaluación de su contenido. Cada uno de los cuatro viales se sometió al mismo proceso de evaluación.



Figura 2-1 Diferentes partes del proceso de sellado del vial. El vial mostrado aquí es el de AstraZéneca. Los tres mismos componentes de sellado estaban presentes en los viales Moderna y Pfizer.

2.2. Proceso de toma de muestras y preparación de portaobjetos

Etapas 1 – Apertura del vial

La etapa 1 consistió en la apertura del vial mientras se grababa el proceso en la cámara para la posteridad. Cada uno de los viales estaba sellado con un precinto de plástico en la parte superior (figura 2.1). Este precinto debía romperse para poder acceder a la tapa de goma del vial de inyección. La tapa de goma se mantenía en su sitio con un anillo metálico.

Había dos opciones para acceder a los líquidos desde el interior de los viales. Una de ellas era utilizar una jeringa de inyección y extraer la cantidad de líquido necesaria. Sin embargo, sabiendo que el objetivo del estudio era identificar y notificar cualquier nano partícula de grafeno dentro de los viales, este método de adquisición de muestras no se consideró apropiado. El razonamiento fue que, durante la penetración del vial, la jeringa arrastraría cantidades nanoscópicas de material de sellado de goma, que es un producto de carbono, cada vez que accediera al líquido. Por lo tanto, se adoptó la segunda opción de acceso al material, es decir, romper el anillo metálico y simplemente retirar el sello de goma de la parte superior cada vez que se requiriera el material de la muestra.



Etapa 2 – Submuestreo para la evaluación de los pasos experimentales necesarios

La etapa 2 tenía por objeto simplemente la primera evaluación de la muestra. Como no se disponía de un estudio previo para determinar la química y las propiedades físicas del material, se utilizó una pequeña submuestra del frasco para evaluarla con un microscopio polarizador a fin de identificar la composición bruta del material de la vacuna y conocer brevemente las inclusiones, si es que las había.

Cada uno de los principios activos de la vacuna parecía haber sido conservado en un medio rico en sacarosa y sal. Las propiedades ópticas y físicas del medio de conservación suponían un reto para la identificación de las inclusiones reales. Además de tener casi el mismo índice de refracción que el medio, la naturaleza micro y nanocrystalina de las inclusiones esperadas supuso un impedimento adicional para la tarea de su aislamiento.

Durante la evaluación microscópica en húmedo en los laboratorios en seco, se observó desde el principio que el material más denso se asentaba en el fondo del portaobjetos y se impregnaba e incrustaba con la solución del medio, mientras el portaobjetos aún estaba en proceso de examen en húmedo. Además, la deposición de las inclusiones se produjo a diferentes profundidades dentro del medio.

Estas características suponían un grave problema para el objetivo central del estudio, ya que era imposible aislar los objetos de interés. El medio enmascaraba todas las señales de las inclusiones por impregnación e incrustación de manera que las inclusiones quedaban completamente camufladas en el fondo.

Se intentó anular estos problemas mediante la filtración al vacío. El primer intento de filtrado al vacío fracasó debido a un fallo del equipo. Esto provocó la pérdida del material de prueba. Como, en el momento de este experimento, el material con el que se contaba era bastante limitado, se interrumpió cualquier intento posterior de ambos procesos de filtración al vacío.

(Cabe señalar que, en la continuación de este proyecto, se utilizará la filtración química para aislar las inclusiones desde el principio, ya que el proyecto actual ha proporcionado una visión clara de la química del producto).

Etapa 3- Partición de la muestra para la preparación de un portaobjetos limpio

Esta etapa incluyó la partición de la muestra en dos. Las porciones limpias de la muestra se guardaron en un vial de vidrio pyrex que se limpió con hidrógeno peróxido, baños clorhídricos y luego se enjuagó con agua destilada. A continuación, los viales se esterilizaron en la cámara de esterilización antes de transferir la muestra a ellos.



A continuación, se transfirieron 0,0125 ml de la muestra a portaobjetos limpios dentro de la vitrina y se dejaron secar al aire a 20 °C bajo una cámara de cristal.

Los portaobjetos secos se montaron con cubreobjetos de vidrio y se utilizaron para la evaluación microscópica. Cabe señalar que ninguno de los portaobjetos limpios preparados se secó completamente, ni siquiera después de varios días.

Etapas 4 - Microscopía óptica y petrológica

Los portaobjetos preparados se examinaron con un microscopio de luz de reflexión y transmisión para el contenido orgánico y con un microscopio petrológico para el contenido mineral.

En la etapa de microscopía se prepararon varios portaobjetos de prueba para identificar la naturaleza típica del contenido.

En los portaobjetos representativos, se realizaron recuentos a lo largo de un transecto específico. A continuación, se representaron en psimpol para obtener opciones de densidad en un 0,006 ml típico de muestra.

Etapas 5 - Muestreo y preparación Raman

Se obtuvieron submuestras de los viales originales para la espectroscopia Raman. Se transfirieron a portaobjetos estándar utilizando pipetas de vidrio esterilizadas. Los portaobjetos se dejaron secar en cámaras de vidrio dentro de un horno de calefacción con ventilador antes de llevarlos a examinar a los Laboratorios Raman..

2.3. Espectrografía Raman

Como la mayoría de las inclusiones observadas pertenecían categóricamente a compuestos de carbono, la espectroscopia Raman fue el método elegido para la identificación inicial de las inclusiones. Todos los espectros Raman se registraron en aire y a temperatura ambiente en geometría de retrodispersión utilizando el espectrómetro Raman Renishaw in Via. Se utilizó un láser de iones Ar sintonizable como fuente de excitación de 488 nm. El rayo láser se enfocó estrechamente sobre la superficie de la muestra a través de un objetivo de microscopio Leica 50x LWD con una apertura numérica igual a 0,5, lo que llevó a un diámetro del rayo láser de aproximadamente 2µm. La resolución espectral era de unos 2cm⁻¹.



3.Resultados

3.1. Descripción de las Inclusiones

El análisis del contenido de los cuatro viales identificó objetos que son similares. Para facilitar la nomenclatura y descripciones relacionadas por vacuna, estas inclusiones estan fotografiadas y definidas a continuación:

Las inclusiones identificadas fueron:

1. Nanocintas de Grafeno cubiertas con Polietilenglicol.
2. Forma Compuesta de Grafeno 1
3. Forma Compuesta de Grafeno 2
4. Calcita microcristalina con inclusiones carbonáceas
5. Nano formas de Grafeno con y sin fluorescencia.

a. Nano objetos de Grafeno

b. Nanorollos de Grafeno.

Intelligence Defence & Security

3.1.1. Compuestos de Grafeno en forma de Nanocintas.

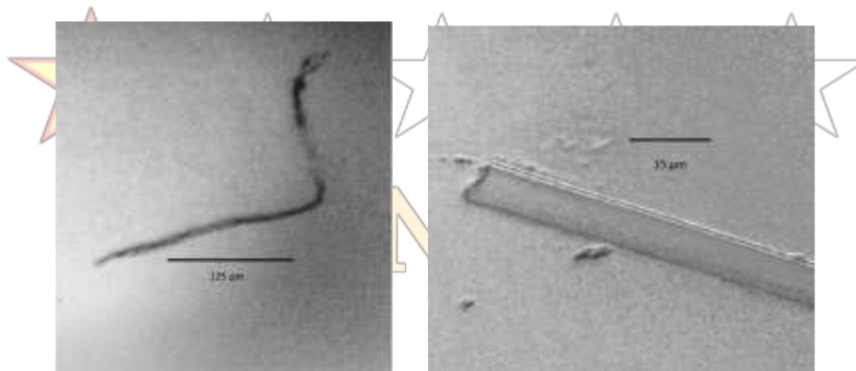


Figura. 3.1. Formas de cinta de compuesto de carbono de una muestra en Moderna 01. La primera imagen es de una muestra húmeda y a un bajo aumento. La segunda imagen es la de la misma muestra cuando está seca e incrustada en la solución a gran aumento.

Esta forma de microinclusión aparece de color gris oscuro en los portaobjetos húmedos, pareciendo cintas filamentosas. Cuando el material se seca, la forma se vuelve casi transparente. A grandes aumentos de 40x, las estructuras laminares pueden identificarse como láminas. El espectro Raman de estas láminas muestra un enlace carbono-oxígeno con huellas de polietilenglicol añadidas (figura 3.9). Se requiere un mayor alcance del Raman para comprender mejor la distribución de los defectos y otras características de esta forma.



3.1.2. Compuesto de Grafeno forma 1

CG1 aparece en forma doblada translúcida de aproximadamente 10-15micras de ancho.

La forma es de transparente a translúcida en la luz transmitida y muestra la estructura de la luz en su interior.

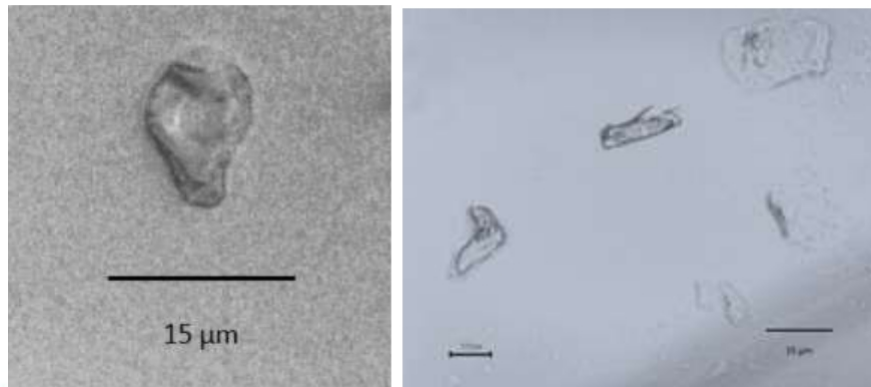


Figura 3.2. Un conjunto de diferentes formas con algunas incrustadas en la solución que aparecen translúcidas y las de la parte superior muestran un buen relieve.

El CG1 es isótropo bajo polares cruzados. Los resultados espectroscópicos Raman para esta forma muestran picos duales dominantes de calcita a 1100 cm⁻¹ y de alguna forma de óxido de hierro cerca de 500 cm⁻¹. El espectro más allá de 1300 cm⁻¹ es bastante turbio debido a la presencia de cierta fluorescencia.

3.1.3. Compuesto de Grafeno forma 2

Estas formas son visiblemente más intrincadas y dan una firma Raman bastante compleja. Los componentes descifrados eran grafeno con óxido de hierro y calcita. Las formas son bastante distintas en su estructura laminar.

La caracterización para el enlace carbono-carbono es bastante clara en 1600 cm⁻¹, el pico de 1100 cm⁻¹ se asigna a la calcita.

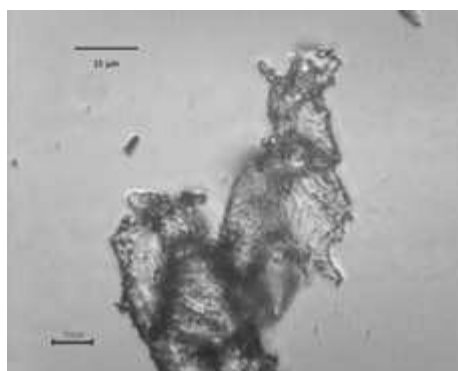


Figure 3.3. Compuesto de Carbono Forma 2



3.1.4. Calcita

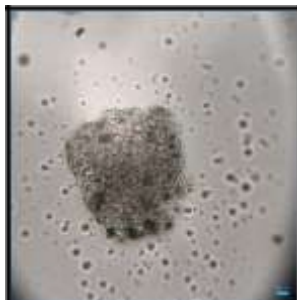


Figura 3.4. Calcita microcristalina con inclusiones de grafeno.

La calcita microcristalina es otra inclusión presente en las muestras. La forma puede describirse como grumosa con inclusiones de nanoformas de grafeno. La forma da una señal Raman muy clara para la Calcita. La calcita también está presente en CG1 y CG2, tal y como se identifica a través de los espectros Raman.

3.1.5. Nano Formas de Grafeno

Se identificaron nanoformas de grafeno en todas las muestras evaluadas (figura 3.5). Al disparar el Raman cuando se enfocaron algunos de estos nano objetos (en diferentes vacunas), se encontró que las señales obtenidas estaban marcadamente enmascaradas por la fluorescencia.

Por lo tanto, la identificación de las nanoformas de grafeno se llevó a cabo sobre la base de la correlación morfológica microscópica con las formas en las que la señal era clara e indiscutible (figura 3.24).

Las nanoformas de grafeno dominaron los cómputos en todas las muestras. Se encontró que estaban presentes tanto en formas redondeadas como en formas espiculadas largas. Las formas redondeadas se encontraron casi en su totalidad en asociación con nano partículas.

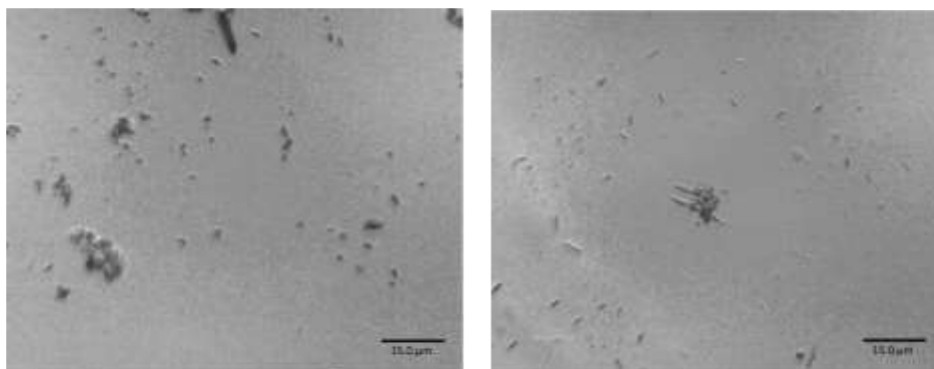


Figura 3.5. (a) Nano formas Grafeno. (b) Nanorollos.



Resulta muy llamativo que las formas espiculadas estuvieran notablemente esparcidas en orientaciones aleatorias en el fondo de todas las muestras que se examinaron (figura 3.5).

Estas nanoespículas de grafeno eran imposibles de evaluar por Raman, ya que su radio era sensiblemente menor que la resolución del láser.

Dado el gran número de espículas de grafeno que se observaron en las muestras, se está llevando a cabo un proyecto independiente centrado en estas espículas, en el que se están realizando investigaciones Raman de alta resolución y FTIR invasivo para establecer las estructuras de estas espículas y obtener una estimación cuantitativa de sus concentraciones.

3.1.6. Formas cristalizadas de la solución

Las cuatro vacunas tienen una base de azúcar, y en los bordes del cubreobjetos, a medida que el material se secaba, se cristalizaba en cristales de azúcar de formas variadas. La figura 3.6 muestra algunas formas variadas de estos cristales bajo luz polarizada.

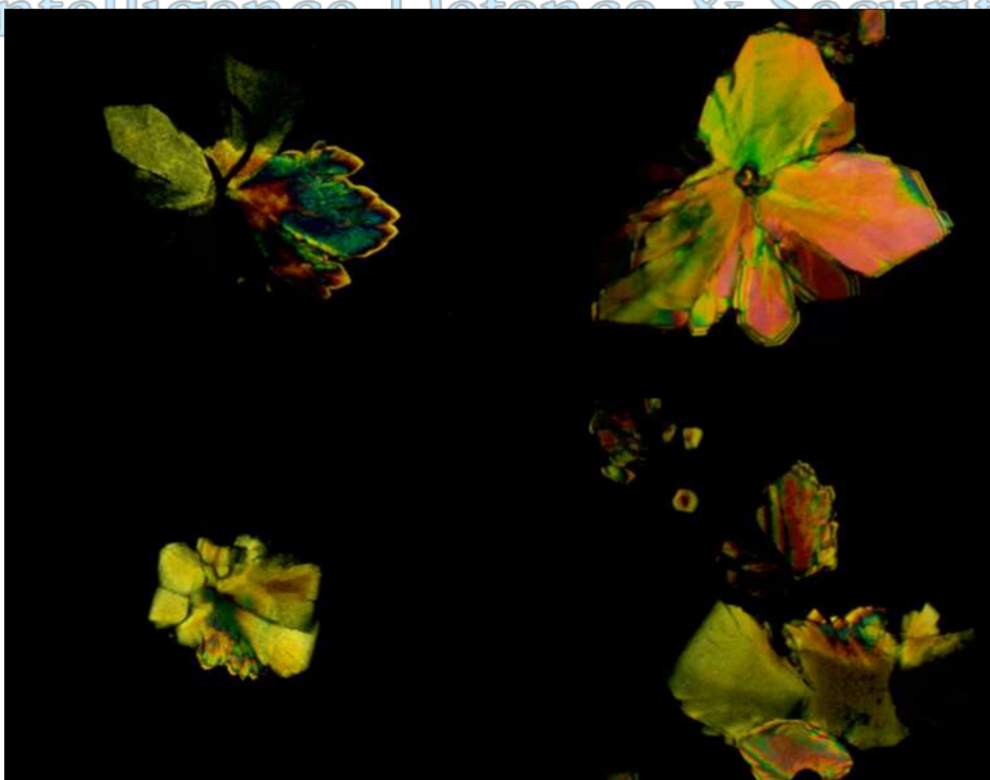


Figura 3.6. Cuatro formas diferentes de cristales de base de azúcar identificadas en un portaobjetos seco de Moderna. Los cristales muestran colores de interferencia de tercer orden bajo luz polarizada con una extinción angular en la mayoría de los casos. Los cristales proceden de núcleos distintivos.



3.2. Moderna 01

3.2.1. Microscopía

Moderna 01 fue la primera muestra que se evaluó. Al microscopio húmedo, la muestra mostraba varias formas filamentosas (figura 3.7). Estas formas parecían desprenderse de algunos de sus filamentos en forma de pequeñas escamas (figura 3.7).

Al secarse el portaobjetos, estas formas filamentosas se incorporaron al medio de la solución y fueron ópticamente difíciles de distinguir del fondo (figura 3.8).

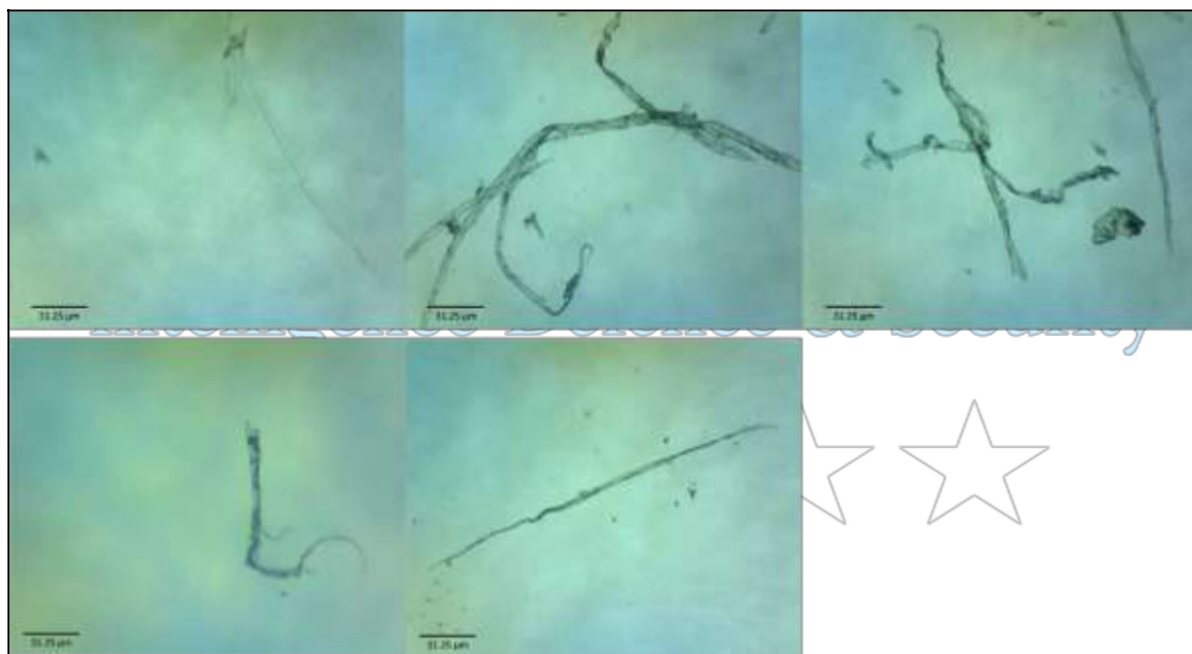


Figura 3.7. Formas filamentosas observadas bajo microscopía húmeda

En el estado seco, se identificaron varias formas de inclusiones particuladas. El asentamiento de estas inclusiones tuvo lugar en múltiples niveles dentro del medio solidificado. El material más ligero se posó y asentó en la parte superior y el más denso se encontró en el fondo del portaobjetos.

La solución cristalizada parecía ser bastante viscosa, y se solidificó en un grueso patrón de múltiples capas que es bastante obvio en forma de grandes láminas con perforaciones (figura 3.9). En los bordes del portaobjetos, el material cristalizó en cristales pleocroicos procedentes de un núcleo semilla (figura 3.6). Las propiedades ópticas de estas estructuras mostraban colores de interferencia de tercer orden junto con la clara presencia de un núcleo de crecimiento que identificaba claramente que estos cristales estaban formados por la solución anfitriona que incluye sacarosa.



Las estructuras en forma de cinta se observaron en dos estados de deposición. Uno, en el que la estructura parcial de la inclusión era visible por encima del medio solidificado y parte de ella era casi transparente y estaba incrustada en el medio y otro estado en el que la cinta estaba incorporada en el medio y era apenas distinguible. Las porciones incrustadas parecían crear una geometría cuadrilátera con una débil señal visual que parecía una cinta plegada (figura 3.6).



Figura 3.8. Formas de cinta parcialmente incrustadas en el medio. Cristales cuadrados y cuadrilaterales en el fondo.

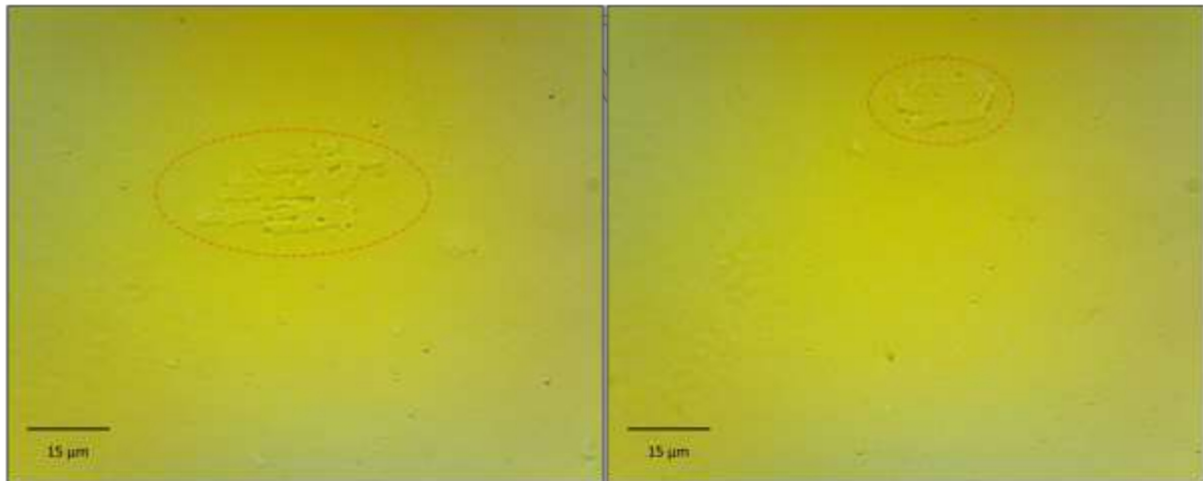


Figura 3.9. Sedimentaciones planas, perforadas y en varias capas en el medio.

La figura 3.10 muestra varias formas representativas que se encontraron en la vacuna. Estas formas iban desde formas transparentes o translúcidas similares a una hoja, hasta materiales oscuros casi opacos similares al carbono amorfo de diferentes tamaños (figura 3.10j,k).



Global Humanitarian Crisis Prevention and Response Unit

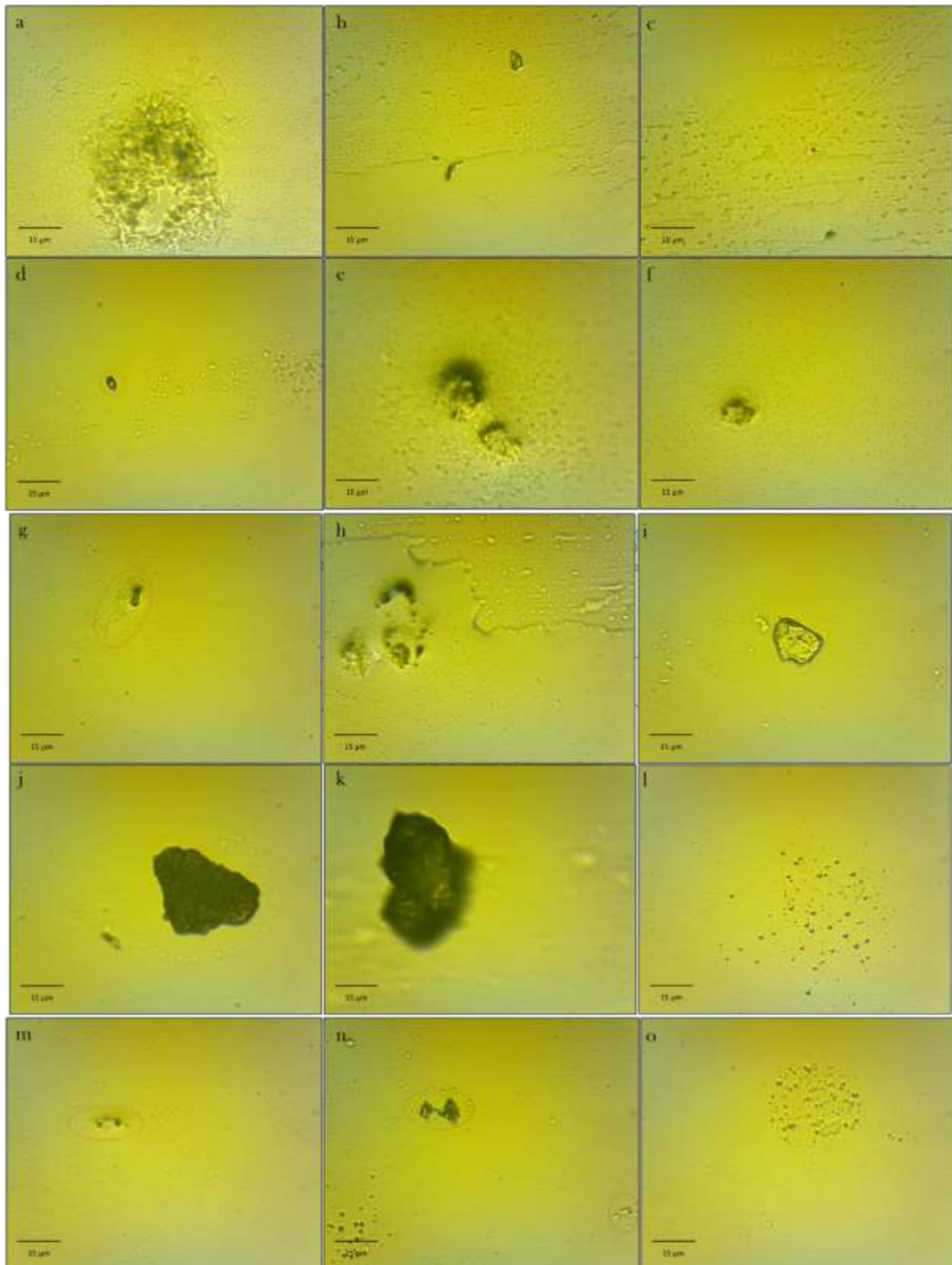
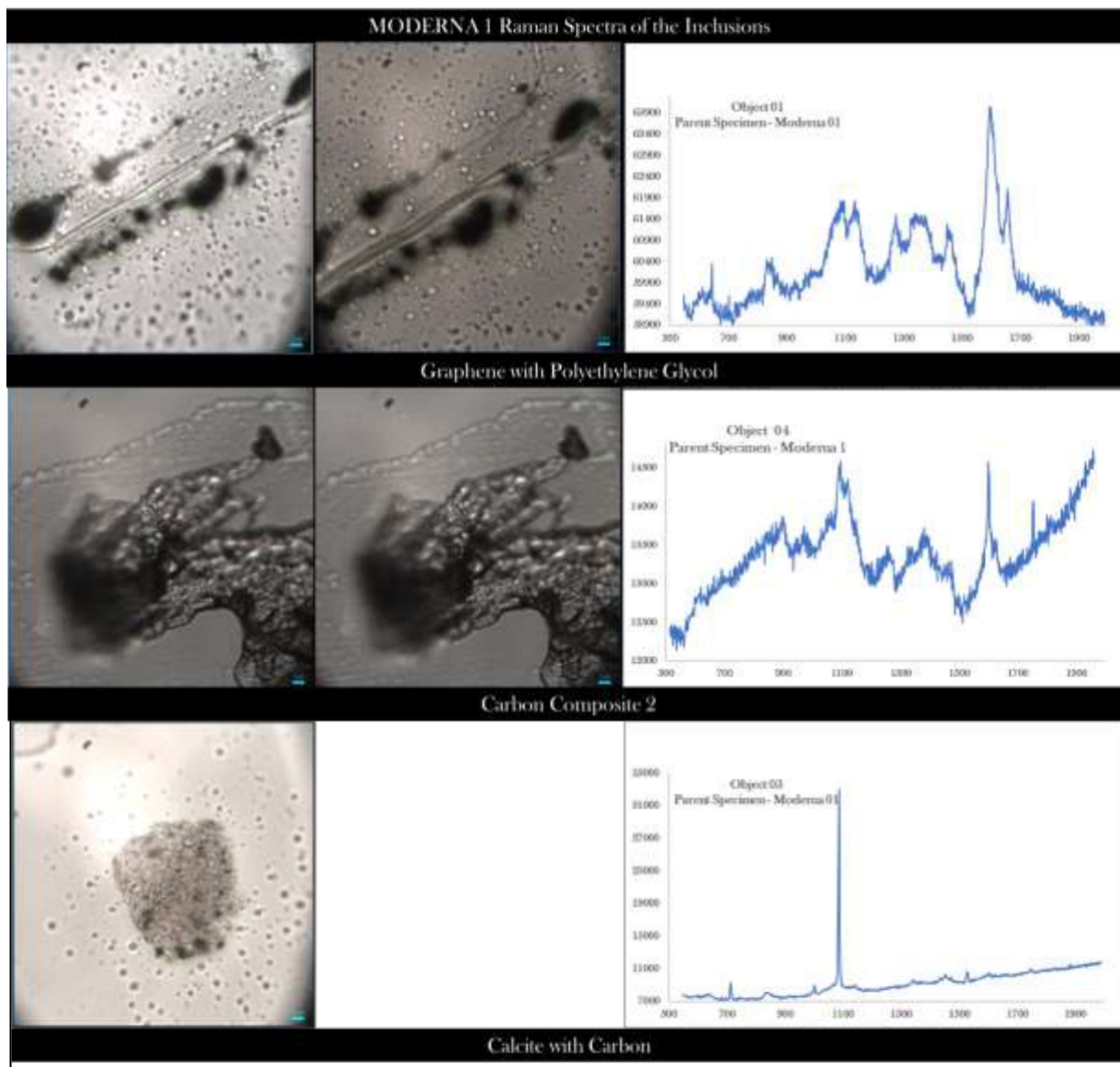


Figura 3.10. Varias inclusiones encontradas en Moderna 01.



3.2.2. Investigación con Espectrografía Raman

Se examinaron inclusiones representativas del Moderna 01 mediante espectroscopia Raman. La investigación mostró claramente que todas las inclusiones tienen una fuerte señal de carbono con composiciones de grafeno confirmadas de algunas formas representativas.





Global Humanitarian Crisis Prevention and Response Unit

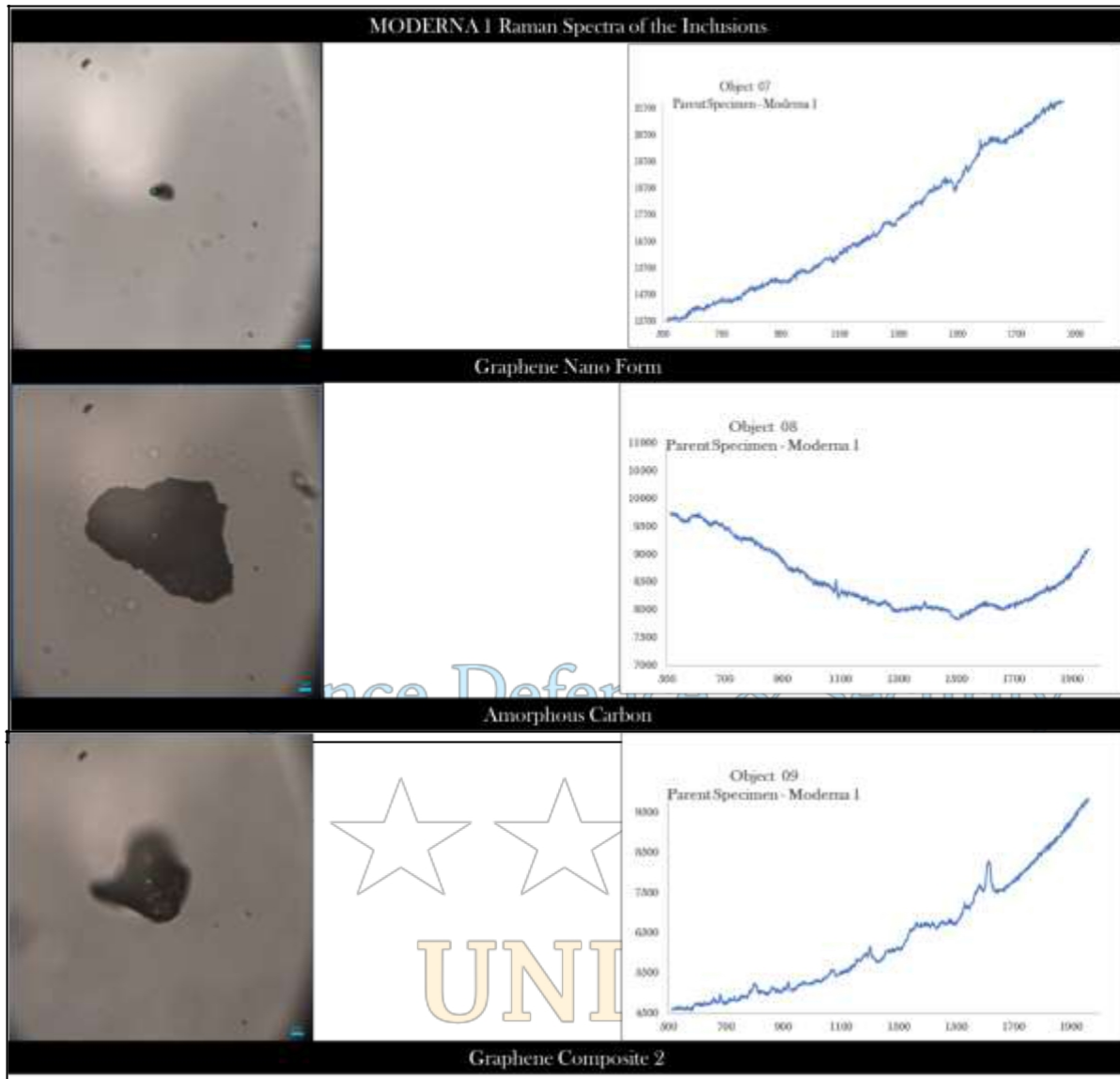


Figura 3.11. Espectro Raman de inclusiones representativas en Moderna 01.

Las dos señales Raman claras se obtuvieron de dos objetos. Las inclusiones planas en forma de cinta mostraron espectros claros de grafeno integrados con el espectro del polietilenglicol y otros compuestos menores. La otra señal clara se obtuvo a partir de una forma microcristalina de calcita con un fuerte pico distintivo a 1100cm^{-1} . Las formas compuestas de carbono tenían una señal muy complicada con un claro pico de grafeno a 1600cm^{-1} , pero otros picos a 1100cm^{-1} que hacían la señal bastante difícil de separar. Actualmente se están realizando más análisis para aislar estas señales e identificar los otros componentes de esta forma de carbono. Algunas formas de carbono nano amorfo mostraron una clara señal de grafeno, sin embargo, estas formas también mostraron fluorescencia que enmascaró el pico de grafeno. Estas mismas formas se identificaron también en otros viales de vacunas, lo que permitió establecer con seguridad la consistencia de su composición en el espectro de varias muestras.



Global Humanitarian Crisis Prevention and Response Unit

Las identidades composicionales derivadas de las inclusiones a través de la espectroscopia Raman se utilizaron para cuantificar la ocurrencia comparativa de estas inclusiones a lo largo de una pista 2D. Esta abundancia se presenta como recuentos en la siguiente sección.

3.2.3. Recuento

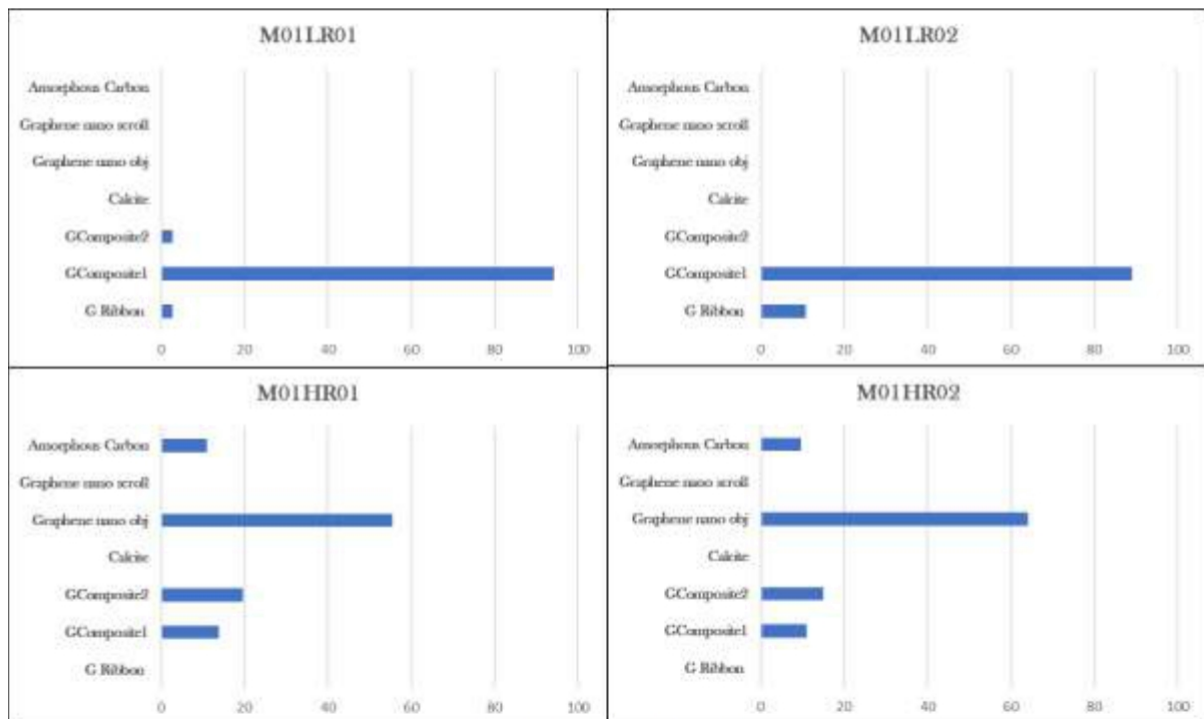


Figura 3.12. Hojas de recuento a bajas y altas resoluciones a lo largo de dos pistas cada una para Moderna 01.

Las inclusiones se contaron a lo largo de dos pistas. Cada pista tenía una longitud de 2 cm. Los recuentos se realizaron tanto a bajo como a alto aumento.

La distribución del recuento está dominada en la baja resolución por el GComposite 01. A baja resolución, el GComposite 2 está presente en cantidades muy bajas, pero la abundancia se invierte a mayores aumentos. En general, los recuentos están dominados por los nanoobjetos de grafeno (figura 3.11).

Cabe señalar que en los recuentos se han omitido los nanorrollos de grafeno. Este paso fue necesario porque, aunque estos nanorrollos forman un porcentaje significativo de los recuentos totales, no se pudo obtener una confirmación de su composición dentro de las limitaciones de este proyecto. Como se menciona en el apartado 3.1.5, la investigación exhaustiva de estas formas constituye ahora el objeto de un segundo proyecto de investigación mejorado tras este informe.



3.3. Moderna 02

3.3.1. Microscopía

El material de muestra de Moderna 2 era transparente sobre el portaobjetos con material particular granulado en suspensión. Al observar el material del portaobjetos bajo el microscopio húmedo, se observaron varios trozos flotantes de objetos similares a láminas transparentes (figura 3.12). El material más pesado se hundía por tracción de sedimento y saltaba por el portaobjetos mientras el medio se evaporaba bajo la luz de la lámpara microscópica.



Figura 3.13. Hojas flotantes de material translúcido en una muestra húmeda observadas con microscopio óptico. (b) El material detrítico asentado en el fondo de la placa. Las sombras del material flotante más claro pueden verse como figuras oscuras y nebulosas.

En las regiones en las que la columna de solución tenía un grosor considerable, se observaron burbujas que fluían con la corriente subterránea de convección hacia el borde de la extensión del material. La ubicación de estas partículas era claramente llamativa, incluso con el menor aumento. Los gráficos obtenidos al seguir el movimiento de estas partículas eran típicos de los sistemas de autoensamblaje compuestos por partículas que se unen bajo la influencia de diversas fuerzas intermoleculares (figura 3.14).

Aquí se interpreta a la luz del conocimiento, que estas partículas llevan la carga de ARN-m requerida y bajo las condiciones designadas, exhiben las características de auto-ensamblaje utilizando una combinación de interacciones intermoleculares no covalentes tales como efectos electrostáticos, hidrofóbicos, Van der Waals y pi (figura 3.15).

Los procesos de autoensamblaje parecen estar impulsados por un entorno competitivo que cambia constantemente y que está impulsado por los cursores cinemáticos y termodinámicos siguiendo un modelo típico de LaMer. La siembra del proceso parece estar en torno a la forma de ácido nucleico de las moléculas y los nano objetos de grafeno. Según Kulkarni et al. (2018), el crecimiento de la partícula depende de la neutralización del pH y de la migración del lípido neutral no unido ionizable hacia el núcleo de la PNL, independientemente de la carga útil (ARNm, ADN minicircular o ADNp).



Global Humanitarian Crisis Prevention and Response Unit

Estas partículas se observaron omnipresentes a través de las preparaciones de la muestra y cada una de estas estructuras comenzó con la formación de una pequeña partícula como semilla a la que las circundantes se agregaron, sobre la base de las interacciones hidrofóbicas. Lo que parece evidente a través de la observación es que las interacciones hidrofóbicas parecen ser la fuerza motriz dominante del crecimiento de las PNL y las interacciones electrostáticas guían la formación de la semilla y la estabilidad del ensamblaje.

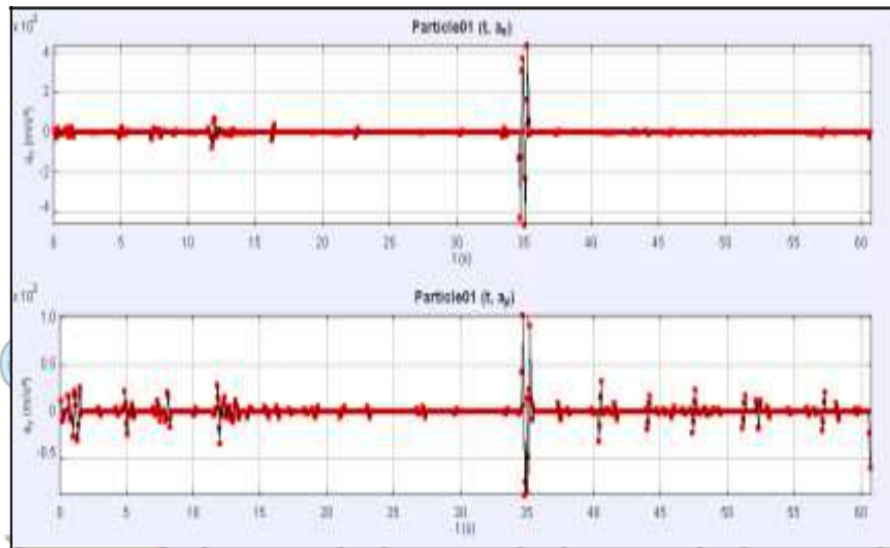


Figura 3.14. Gráfico de desplazamiento de una partícula de autoensamblaje característica. Las aceleraciones en las direcciones X e Y muestran las típicas formas escalonadas que tipifican los saltos y movimientos hidrofóbicos/filicos.

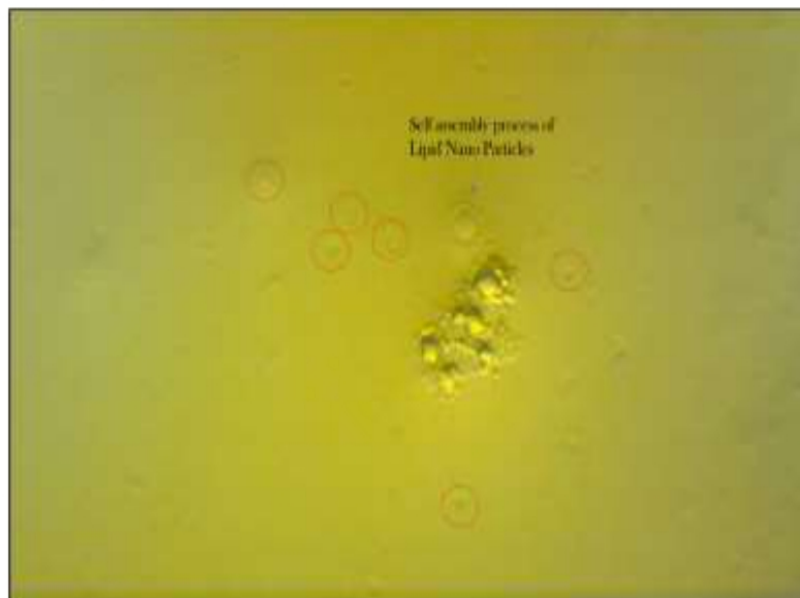


Figura 3.15. Nanopartículas autoensambladas con carga de ARNm.

Al secar la muestra, la solución se asentó en una capa gruesa, que conservaba alguna forma de humedad. El material relativamente más denso se asentó en el fondo, mientras que el material más ligero se encontraba en la parte superior de la solución solidificada, con una capa detrítica adicional en el centro del medio.

La visión general del portaobjetos seco a baja resolución mostraba un medio translúcido con formas parecidas a fibras y láminas transparentes en la superficie superior (figura 3.16).

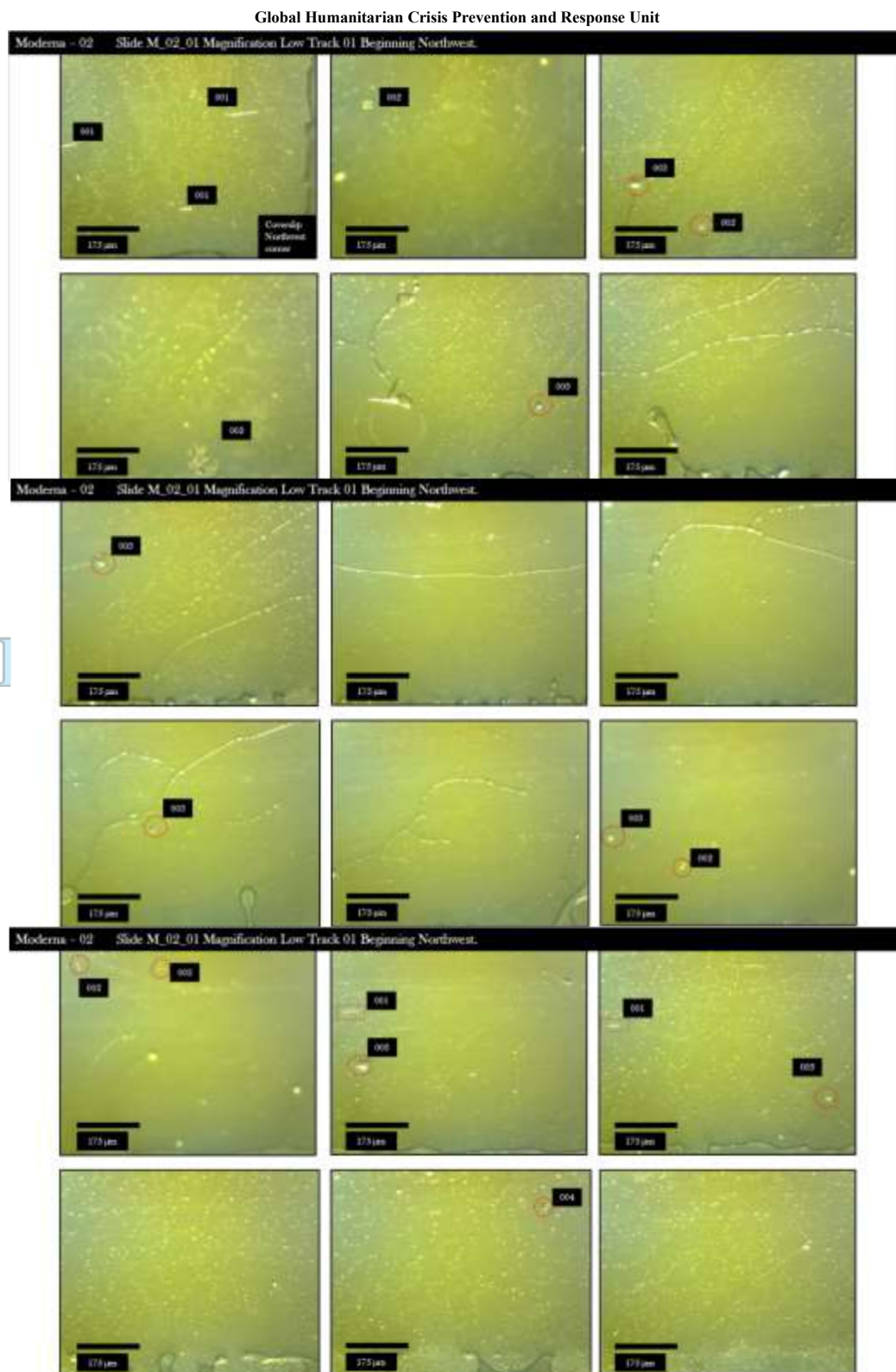


Figura 3.16. Moderna 02 Vista general de la diapositiva con poco aumento.



A magnificación más alta, en la placa aparecía abundante material con formas relacionadas con el carbono. La figura 3.17 muestra diferentes siluetas y formas que fueron detectadas a lo largo de varias transecciones a través de la placa. Es destacable que los depósitos visualizados están en tres planos separados, con una significativa diferencia en la profundidad de enfoque.

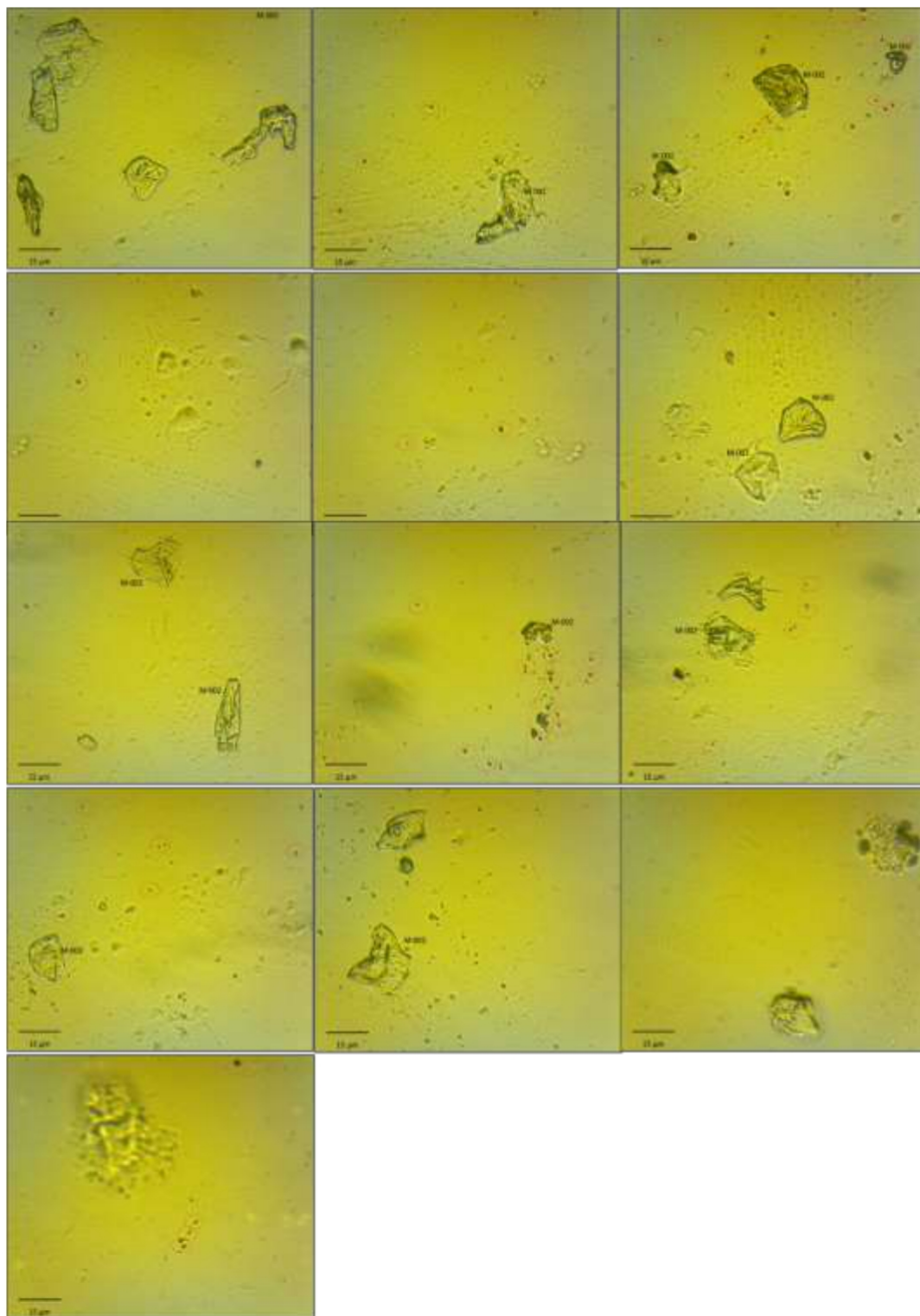
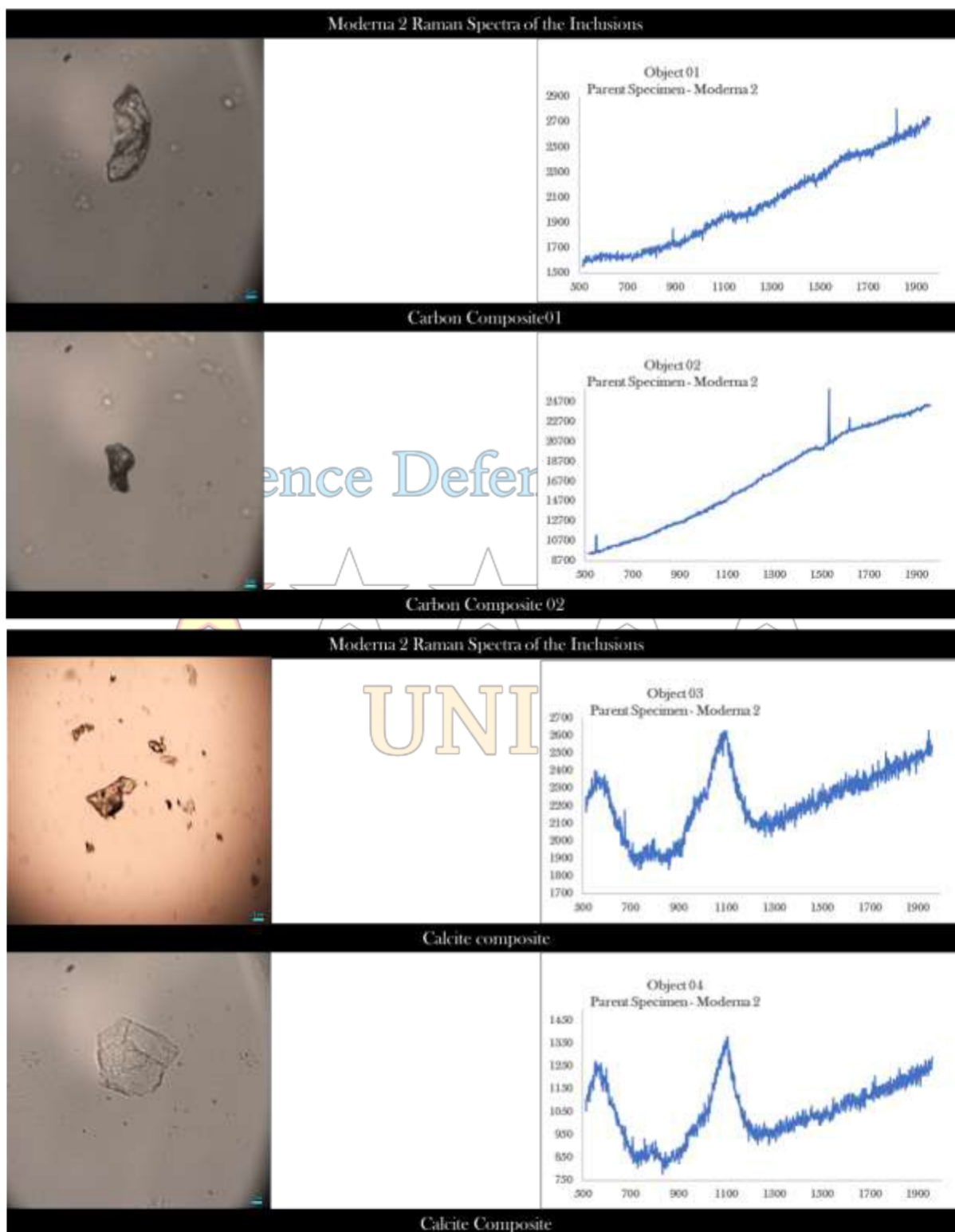


Figura 3.17. Inclusiones representativas en Moderna 2 a magnificación alta.



Global Humanitarian Crisis Prevention and Response Unit

3.3.2. Investigación con Espectrografía Raman



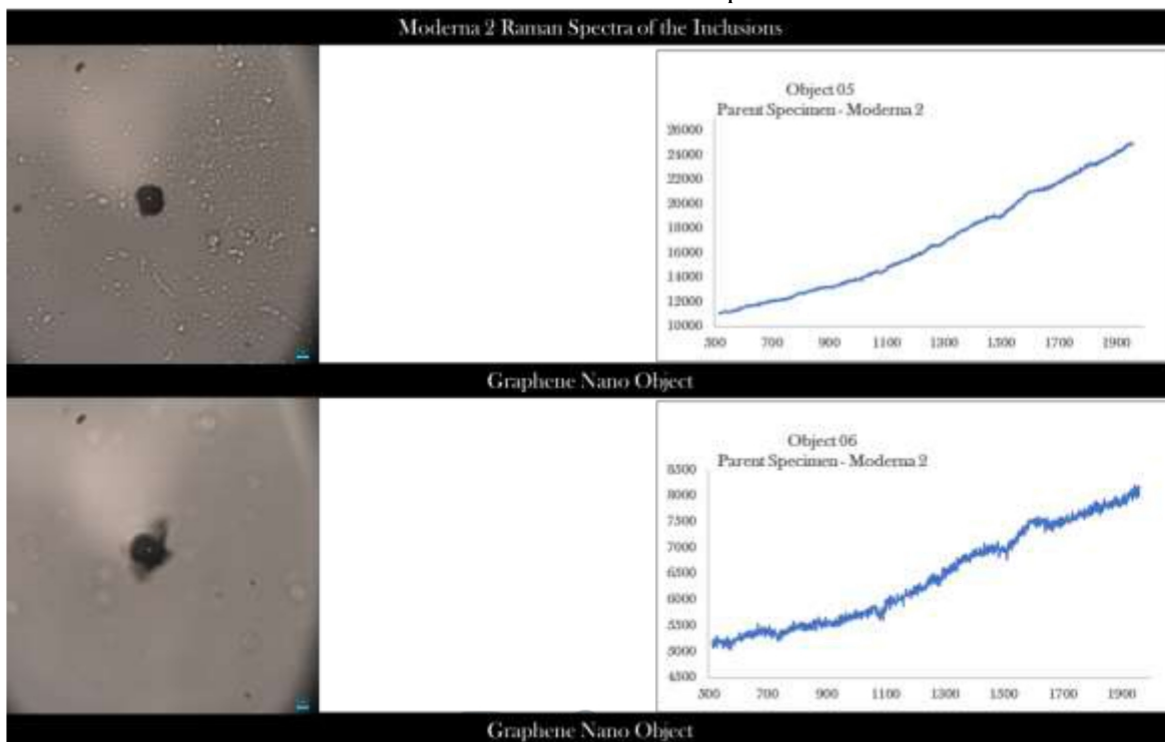


Figura 3.18. Espectros Raman de varias inclusiones en Moderna 02.

Se utilizó la espectroscopia Raman en las inclusiones de Moderna 2 para identificar las principales representaciones de la muestra (figura 3.18). A excepción de las muestras compuestas de calcita, el resto mostró un espectro muy distorsionado. Los picos de carbono en torno a 1600 cm^{-1} y 1350 cm^{-1} sólo eran vagamente discernibles en los nanoobjetos de grafeno. Con el fondo fluorescente, era extremadamente difícil interpretar el espectro para cualquier otro componente excepto el carbono.

Se recomienda encarecidamente volver a fotografiar y procesar los datos para poder identificar estas inclusiones de Moderna con cierta seguridad.

A falta de señales Raman fiables, para el análisis de estas inclusiones se utilizó una similitud comparativa en presencia de las químicas conocidas de las otras inclusiones. Estas químicas se utilizaron para hacer los recuentos que están presentes en la figura.

3.2.3. Recuentos

El recuento de inclusiones a lo largo de cuatro pistas de dos a bajo y dos a alto aumento mostró resultados similares a los de Moderna 01 (figura 3.19). Los compuestos de grafeno 01 tenían una presencia destacada en la resolución más baja y en las resoluciones más altas, los nano objetos de grafeno están presentes en gran abundancia.



Global Humanitarian Crisis Prevention and Response Unit

De los recuentos se desprende que las estructuras nanoscópicas superan con creces los recuentos de densidad de las estructuras microscópicas.

Cabe señalar que en los recuentos se han omitido los nanorrollos de grafeno. Este paso fue necesario porque, aunque estas nanorrollos forman un porcentaje significativo de los recuentos totales, no se pudo obtener una confirmación de su composición dentro de las limitaciones de este proyecto. Como se menciona en el apartado 3.1.5, la investigación exhaustiva de estas formas constituye ahora el objeto de un segundo proyecto de investigación mejorado tras este informe.

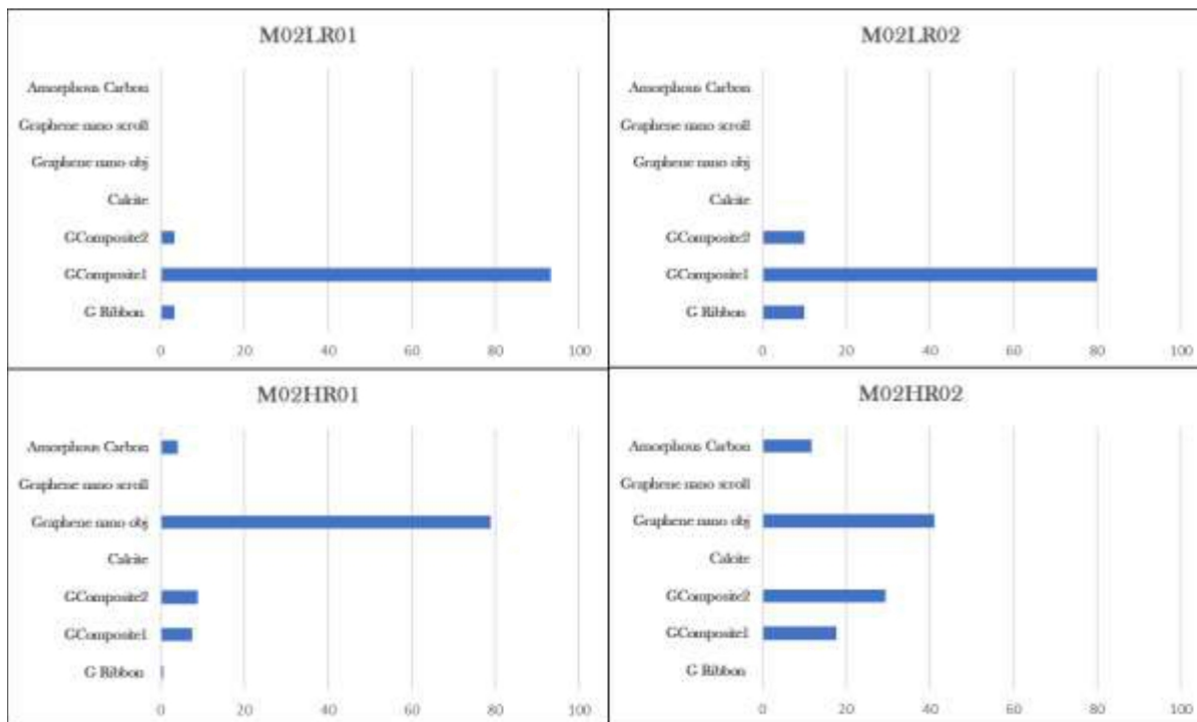


Figura 3.18. Hojas de recuento a baja y alta intensidad a lo largo de dos pistas para Moderna 02.



3.4. AstraZéneca

3.4.1. Microscopía

AstraZeneca fue la tercera vacuna que se evaluó por sus inclusiones. Se observaron al microscopio varias pasadas de las muestras húmedas. La vacuna AstraZéneca es casi transparente cuando se observa al microscopio, lo que facilita la detección de cualquier inclusión con colores inherentes.

La observación al microscopio húmedo fue que la solución fresca presentaba un movimiento instantáneo de material particulado nanoscópico (figura 3.20) que, al observarse de cerca, pasó de ser impulsado por la corriente de convección a ser bastante aleatorio. A medida que la solución se secaba, las partículas mostraban un movimiento de tracción.

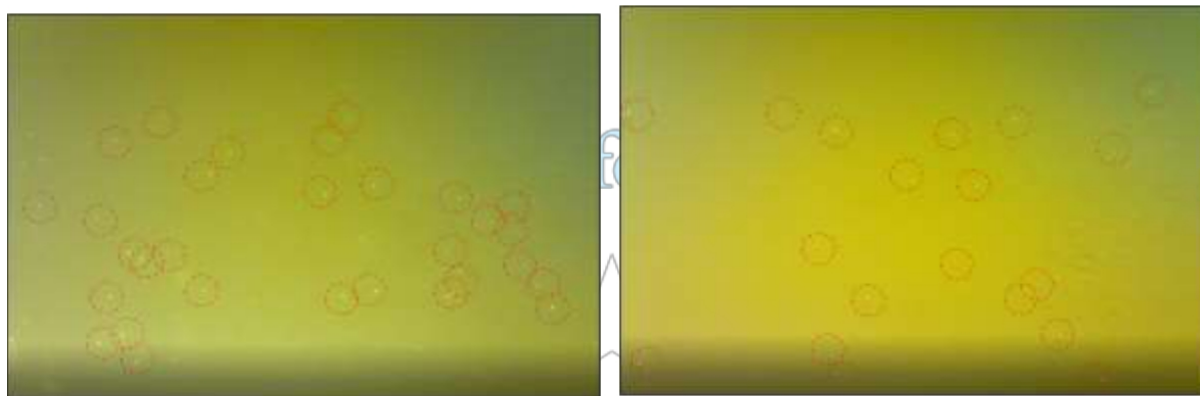


Figura 3.20. Nanopartículas en movimiento cuando la profundidad de la solución es mayor que la altura de la partícula. Las partículas se unen para formar partículas más grandes y la influencia dominante en la dirección del movimiento es a través de las corrientes dentro de la solución.

Al principio, estas partículas nanoscópicas eran bastante visibles como motas blancas que se movían en forma de enjambre en la misma dirección general. Con el tiempo, evolucionaron hasta convertirse en gotas más grandes con vectores más aleatorios siguiendo los principios del autoensamblaje.

A medida que la solución se secaba, por el calor de la lámpara del microscopio desde la parte superior, comenzó el proceso de sedimentación con formas parecidas a láminas que se depositaron en la parte superior del medio que comienza a cristalizar pronto mientras que el líquido de abajo todavía puede fluir parcialmente. Esta diferencia en el ritmo de cristalización o solidificación fue claramente discernible a partir de algunas tomas de diapositivas de un vídeo, tal y como se presenta en la figura 3.21. En la figura, la forma microscópica es claramente visible ya que se encuentra en la parte superior de la lámina sólida, mientras que las nanopartículas siguen en movimiento en el fondo, como puede verse por la posición cambiante de la sombra. Un resultado claro de este mecanismo fue que, a medida que el medio se solidificaba, a las nanopartículas les resultaba más difícil atravesar el material viscoso. El núcleo de las nanopartículas estaba sembrado de nanotubos de carbono y nanoobjetos de carbono: formados por alguna forma de partículas de carbono detríticas. Éstas fueron arrastradas por las corrientes de



eddie en el fondo del medio y, a medida que el material se asentaba, quedaban los moldes acanalados que se identificaban fácilmente en las secciones microscópicas secas.

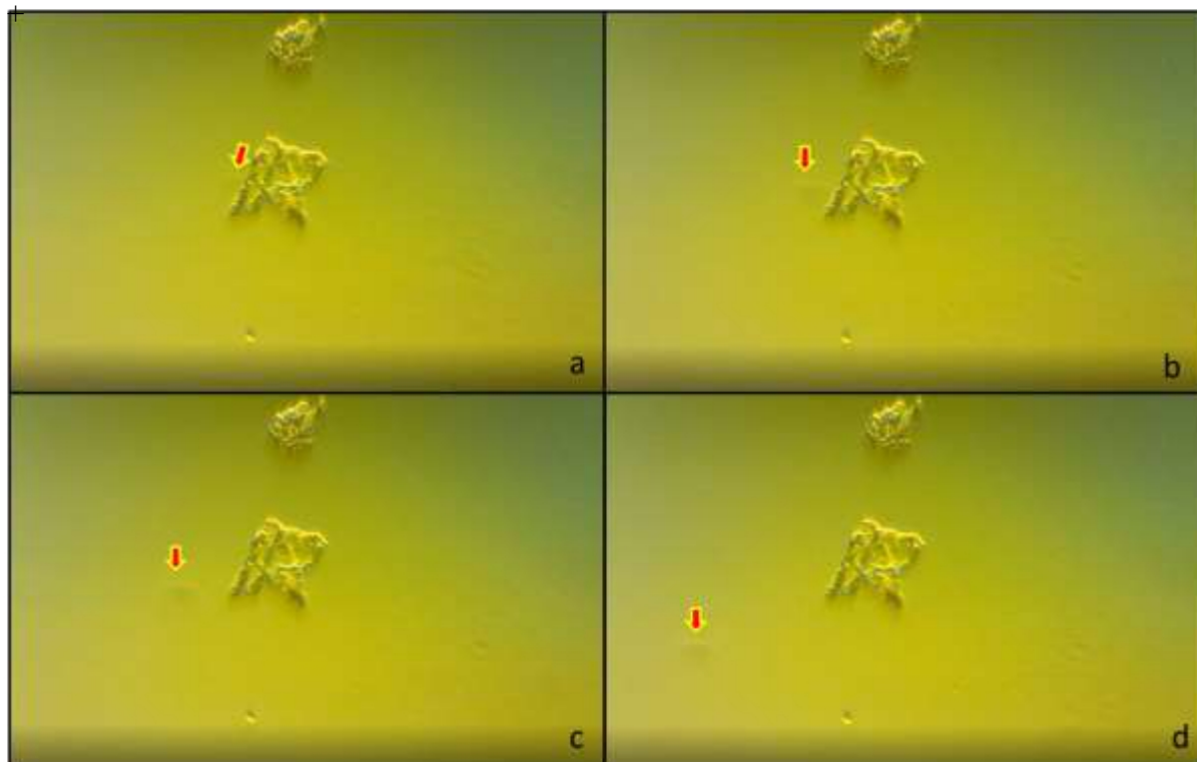


Figura 3.21. Columnas de convección laminar con la parte superior solidificada que da lugar a la deposición de la partícula escamosa. La flecha señala la posición de la nanopartícula en la columna más profunda del material más frío.

Incluso, en un portaobjetos húmedo bajo el microscopio, se observaron varias formas de inclusiones. Éstas se describen en detalle a continuación.

En AstraZéneca se observó un movimiento de nano partículas y un proceso de autoensamblaje, similar al observado en las vacunas Moderna. También en este caso, las nanopartículas se autoensamblaron mediante los típicos movimientos característicos atribuidos a las fuerzas interparticulares. Mientras la solución se secaba, el material de carbono más pesado que se había hundido en el fondo del portaobjetos se desprendió del núcleo de las nanopartículas y éstas empezaron a presentar movimientos de tracción. La figura 3.22, muestra los vectores de movimiento relativos de algunos de estos materiales sólidos. Cuando estas inclusiones se asentaron, se hundieron en los estratos inferiores. Un examen posterior de alta resolución de los estratos inferiores muestra un depósito de nanoobjetos de grafeno (figura 3.23) que incluye nanorrollos de grafeno (figura 3.24).

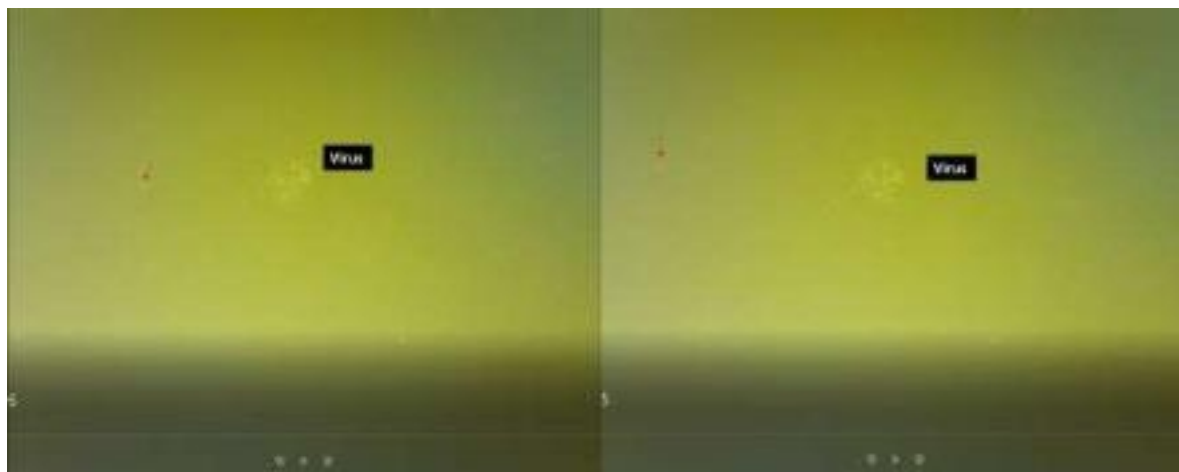


Figura 3.22. Distancia recorrida por el objeto mediante vectores de movimiento combinados

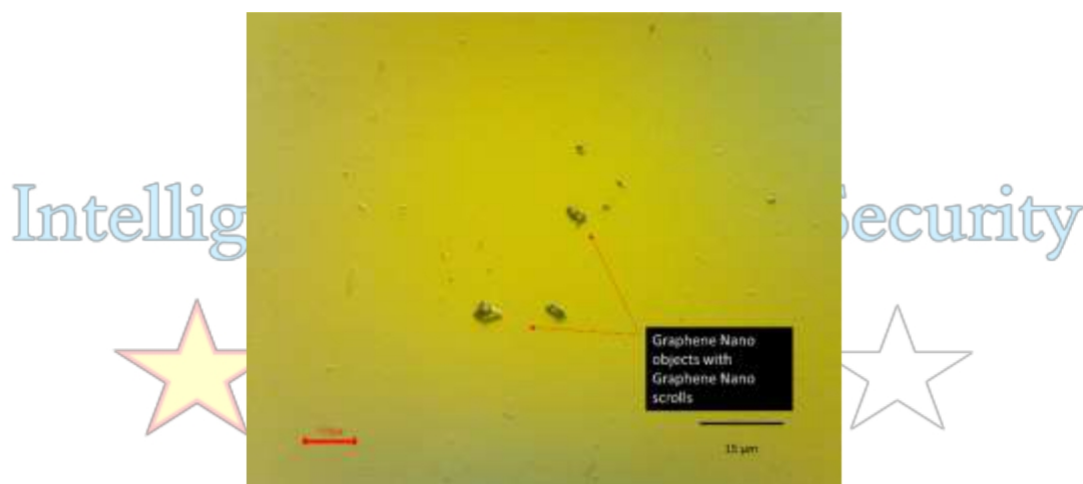


Figura 3.23. Las estructuras basadas en grafeno se asentaron al secarse. Estas estructuras demostraron un movimiento propio frente a la creciente viscosidad de la solución de secado. Cuando la solución se secó, se comprobó que se habían asentado en el fondo del portaobjetos.



Figura 3.24. Rollos de Grafeno o espículas depositadas en el fondo del portaobjetos.

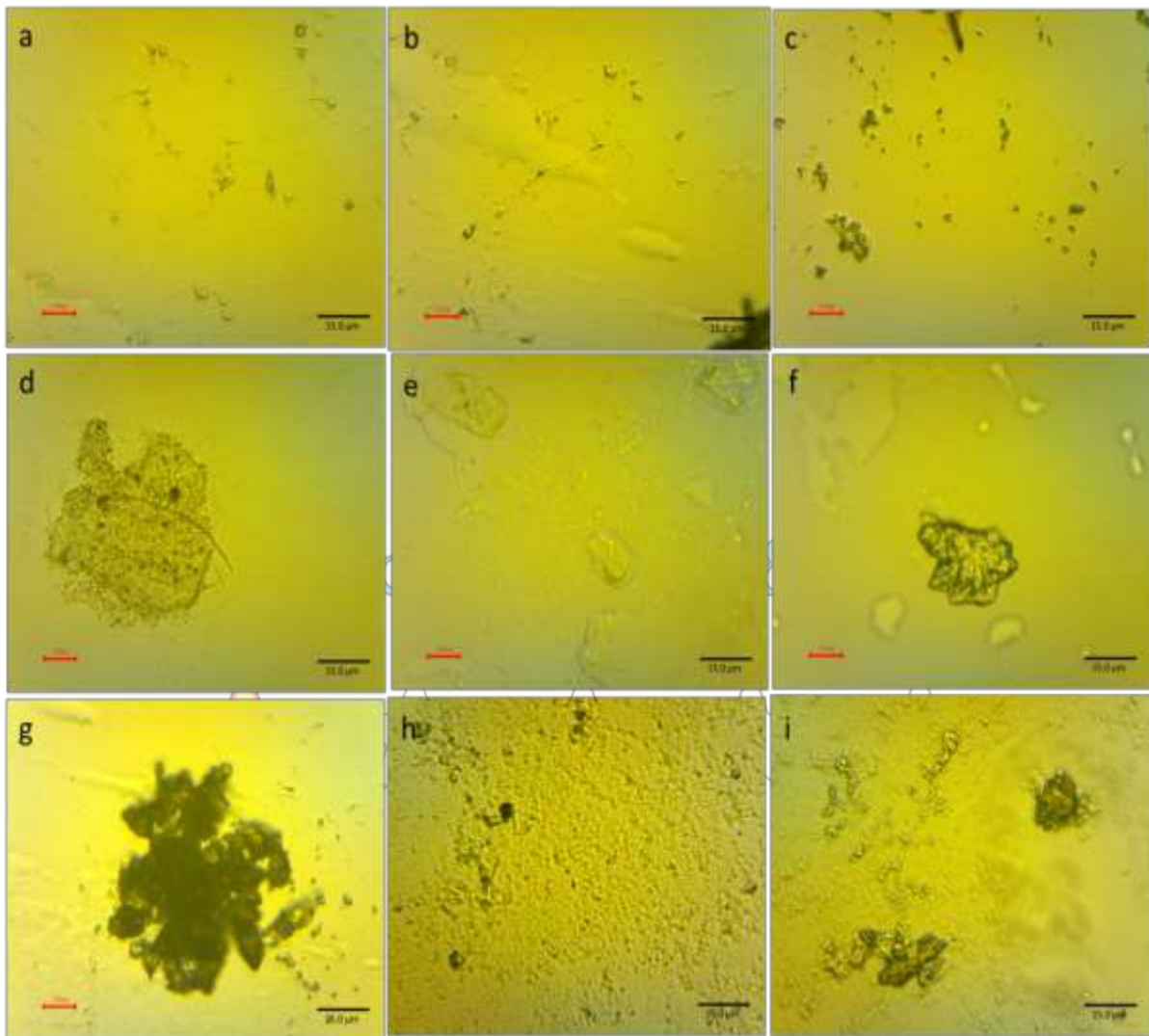


Figura 3.25. Inclusiones representativas encontradas en la vacuna de AstraZéneca.

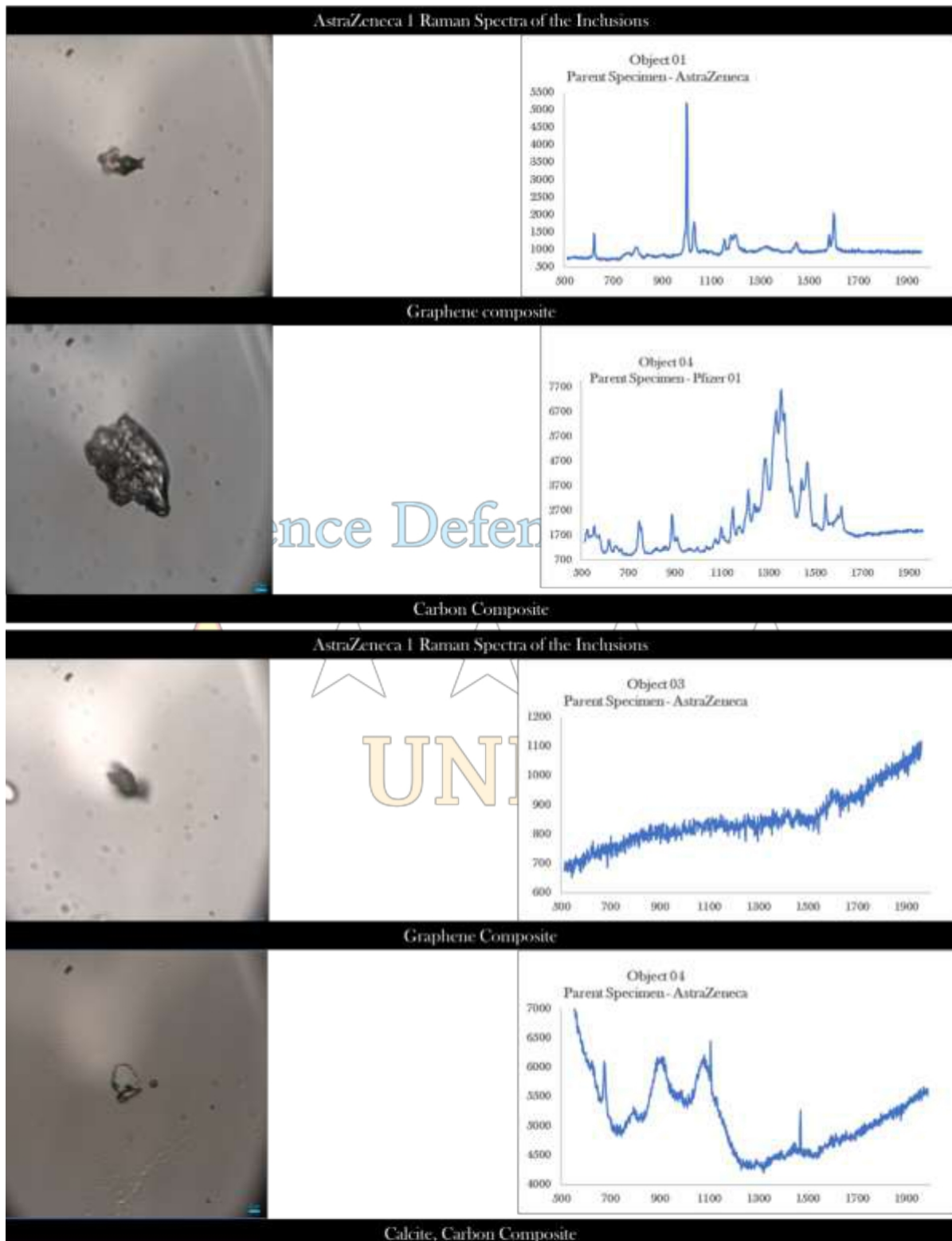
Las inclusiones identificadas en AstraZéneca eran de la misma categoría descrita en la sección 3.1. Éstas incluían compuestos de grafeno de dos variaciones, cintas de grafeno impregnadas con polietilenglicol, nanoobjetos de grafeno que incluían un gran número de nanorollos y un elevado número de carbono amorfo. La calcita también estaba claramente presente en la vacuna en forma de compuesto de carbono microcristalino.

Las inclusiones de tipo fueron objeto de una identificación Raman.



Global Humanitarian Crisis Prevention and Response Unit

3.4.2. Investigación con Espectrografía Raman



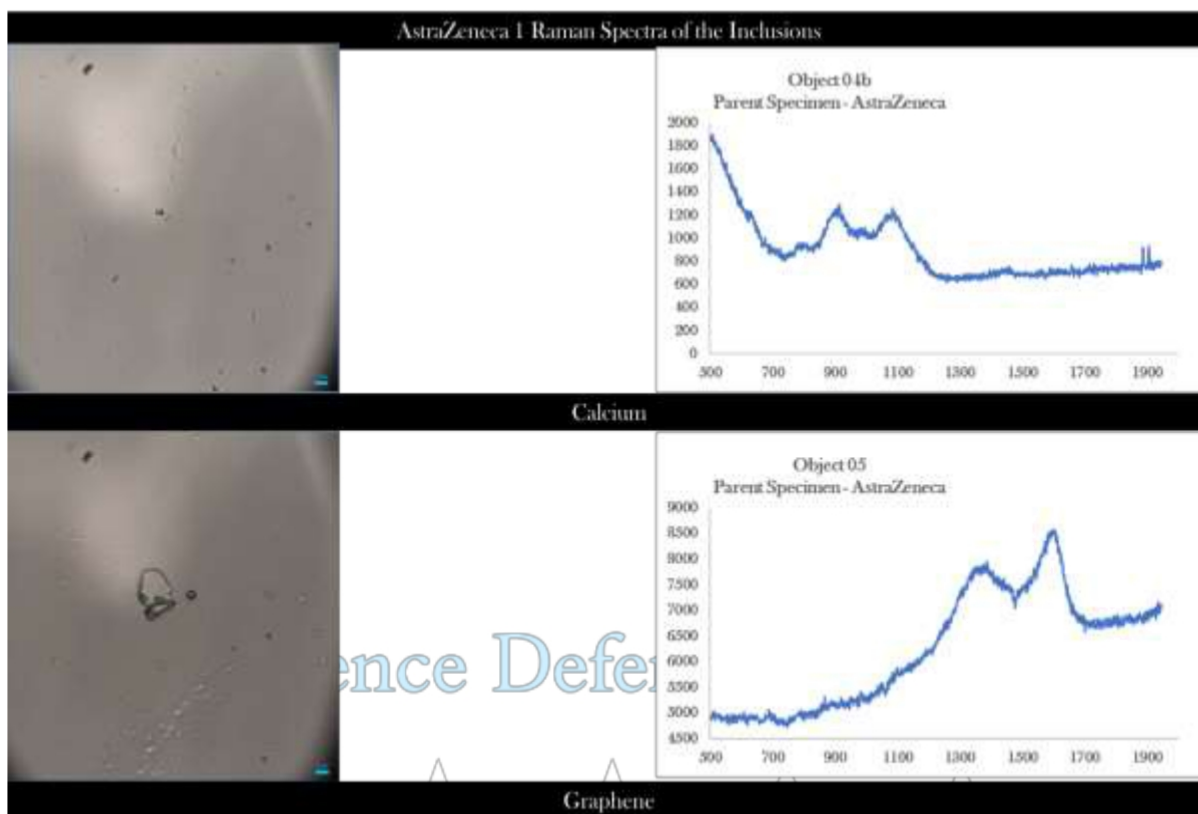


Figura 3.26. Espectros Raman de varias inclusiones en AstraZéneca.

Los resultados de la espectroscopia Raman en las inclusiones dentro de AstraZéneca han permitido confirmar directamente la presencia de grafeno en todas las formas representativas identificadas.

Los compuestos de carbono tienen dos formas, al igual que en las vacunas Moderna. Estas dos formas mostraron firmas de grafeno distintas a través de los picos de grafeno característicos en 1600 cm^{-1} y 1350 cm^{-1} . Además del grafeno, el espectro está dominado por el óxido de hierro y algunas otras formas de asociaciones de carbono.

Se está trabajando para aislar las señales y ayudar a identificar los compuestos individuales. Con la excepción de una muestra de compuesto de grafeno, el efecto de la fluorescencia resultó ser mínimo en las inclusiones seleccionadas por AstraZeneca.

Los compuestos de calcio con carbono también mostraron la misma señal que los presentes en las dos vacunas de Moderna.

Las inclusiones en los compuestos de calcita contenían nanopartículas de grafeno prístinas. Estas partículas fueron evaluadas para mostrar una clara señal de grafeno. Aunque los nano objetos de grafeno estaban presentes en clara asociación con los nanorrollos de grafeno, no se realizaron investigaciones Raman en los rollos debido a la limitación del tamaño del láser y del aumento del microscopio.



Global Humanitarian Crisis Prevention and Response Unit

En futuros estudios sobre AstraZéneca, analizar con Raman los nanorrollos debería ser un objetivo prioritario para cuantificar la concentración de Grafeno.

La identificación de las inclusiones ayudó en el proceso de recuento preciso en la siguiente etapa.

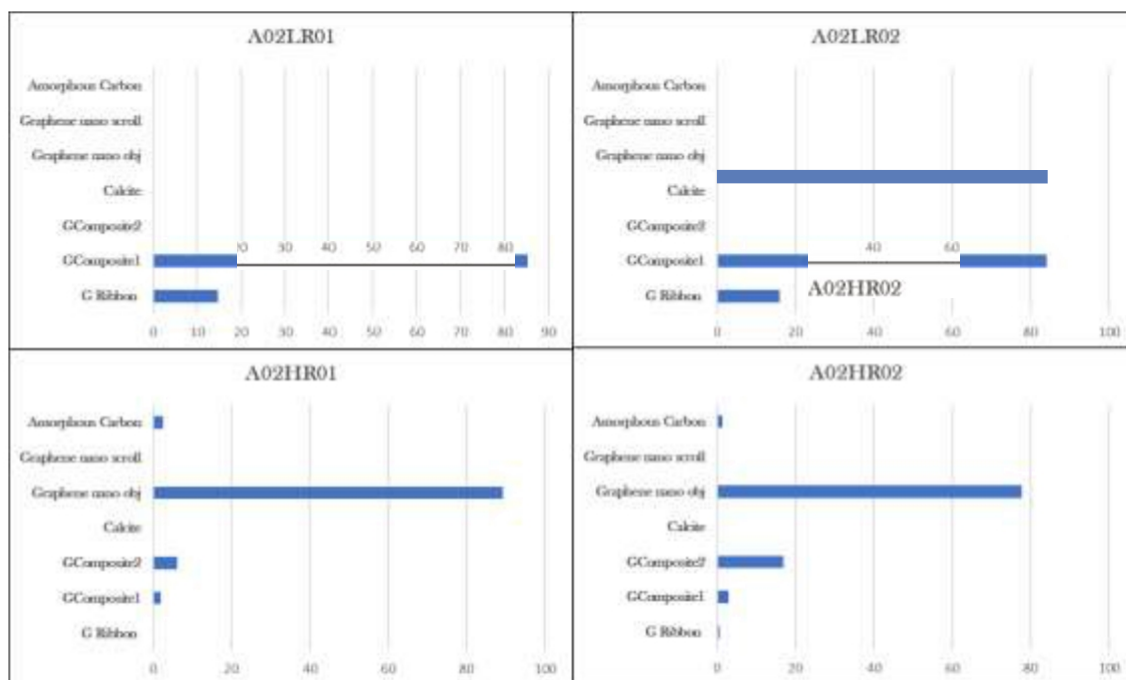


Figure 3.25. Hojas de recuento en baja y alta resolución a lo largo de dos pistas cada una para AstraZéneca.

3.4.3. Recuento

El recuento de AstraZéneca no encontró compuesto de grafeno 2 en las magnificaciones más bajas, aunque están presentes de manera significativa en magnificaciones más altas. Queda claro en el gráfico que los nano objetos de grafeno dominan el recuento a resoluciones más altas.

Cabe señalar que en los recuentos se han omitido los nanorrollos de grafeno. Este paso fue necesario porque, aunque estos nanorrollos forman un porcentaje significativo de los recuentos totales, no se pudo lograr una confirmación de su composición dentro de las limitaciones de este proyecto. Como se menciona en el apartado 3.1.5, la investigación exhaustiva de estas formas constituye ahora el objeto de un segundo proyecto de investigación mejorado tras este informe.



3.5. Pfizer

3.5.1. Microscopía

Pfizer fue el cuarto vial de vacuna que se evaluó por sus inclusiones. Se observó que la vacuna tenía el mismo color blanquecino que Moderna. Se transfirieron 0,006 μ l de la muestra al portaobjetos para su evaluación en húmedo y se dejó una cantidad igual en una pipeta ligeramente inclinada para poder examinarla en un entorno cerrado en 3 dimensiones. El espécimen de la pipeta mostraba algunas inclusiones muy interesantes que no se encontraron cuando se secó el portaobjetos. Al aspirar el material en la pipeta, se observaron distintas láminas entre translúcidas y transparentes flotando (figura 3.28). A partir de observaciones anteriores en AstraZéneca y Moderna, se reconoció que se trataba del compuesto de grafeno 1.

Inmediatamente después se observó una sedimentación activa del material más denso en la curva inferior del cilindro (figura 3.29).

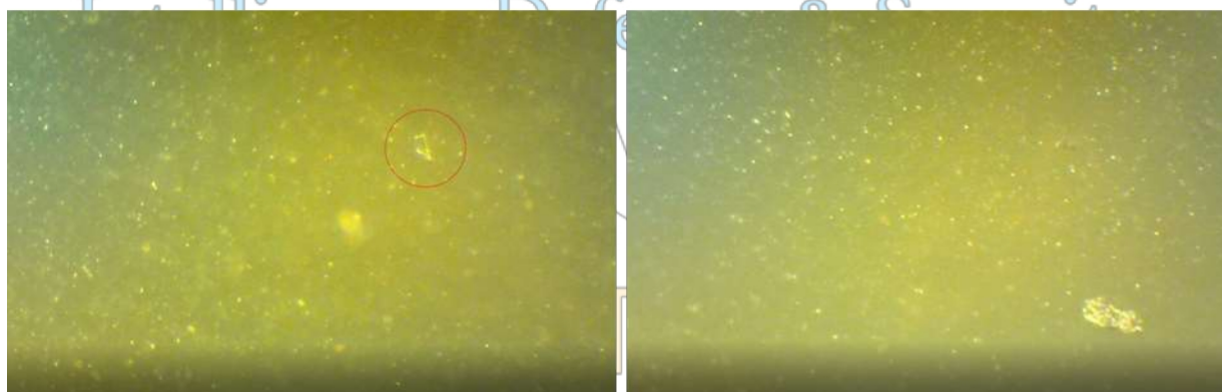


Figura 3.28. Material flotante más ligero. En el fondo, las partículas brillantes doradas son las futuras nano partículas auto-ensamblantes que encapsularán el ARNm.

Los dos objetos de interés que se observaron claramente flotando, pero que no se pudieron localizar una vez que se secó el portaobjetos, fueron: un objeto transparente extremadamente puntiagudo parecido a una espícula (figura 3.30) y el otro era una fina lámina perforada translúcida (figura 3.31).

Aunque ambos objetos son de interés para este estudio, la naturaleza de la espícula sigue siendo vital para identificar en futuros trabajos.

Al verter la solución en un portaobjetos para su observación, la mezcla mostró el mismo mecanismo de autoensamblaje de nanopartículas que se observó en las vacunas de Moderna y AstraZéneca. Cuando el material se secó, las inclusiones se asentaron a distintas profundidades en función de sus densidades relativas.

La figura 3.32 muestra un conjunto de varias formas de inclusión que se identificaron en Pfizer. Éstas pertenecen a la misma categoría mencionada en la sección 3.1.

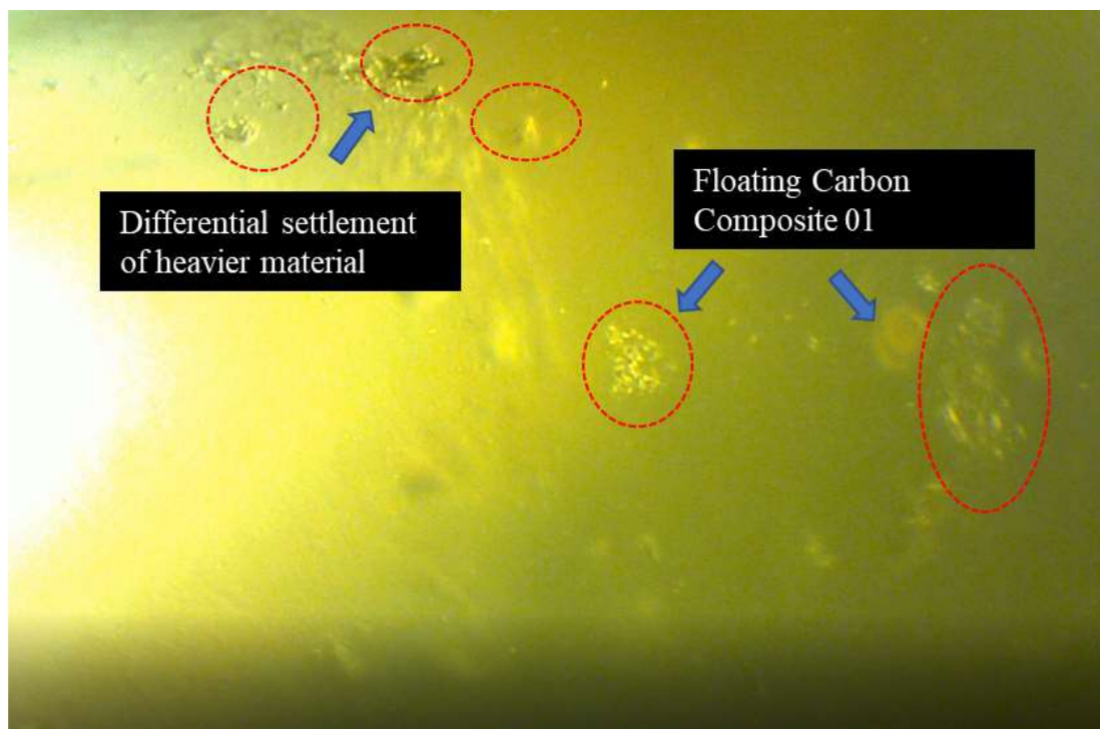


Figure 3.29. Sedimentación de la carga más pesada en la base curvada de la pipeta y compuesto 1 transparente flotante.

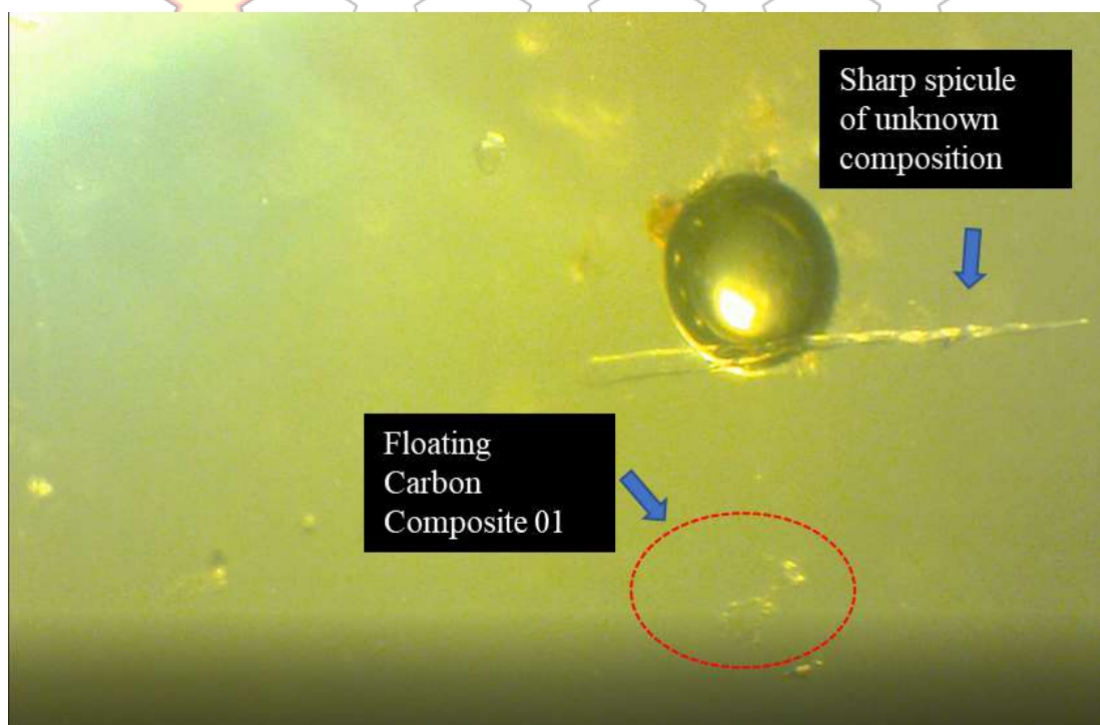


Figura 3.30. Espícula transparente afilada flotando en el líquido.



Global Humanitarian Crisis Prevention and Response Unit



Figura 3.31. Membrana perforada flotante.

En el portaobjetos se encuentran en buen número formas de cinta de microformas casi transparentes. A menudo están medio incrustadas en la solución con un extremo que sobresale del material.

Los compuestos de carbono de las formas 1 y 2 también están presentes en gran número. La forma 1 se asienta en la parte superior del material, mientras que la forma 2 se encuentra en los niveles medios del medio solidificado.

Las nanoformas de grafeno están presentes en buen número en el material del portaobjetos, junto con algunos rollos.

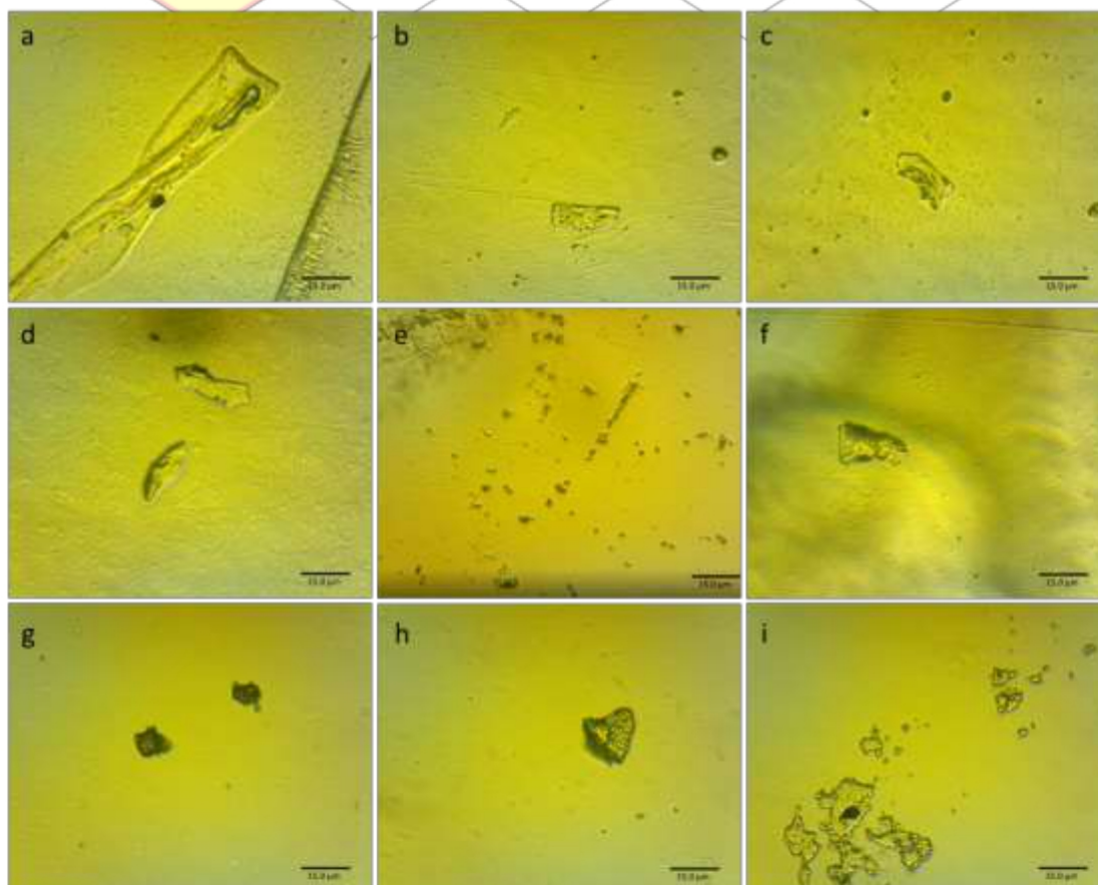


Figura 3.32. Inclusiones representativas encontradas en la vacuna Pfizer.



Global Humanitarian Crisis Prevention and Response Unit

3.5.2. Investigación con Espectrografía Raman

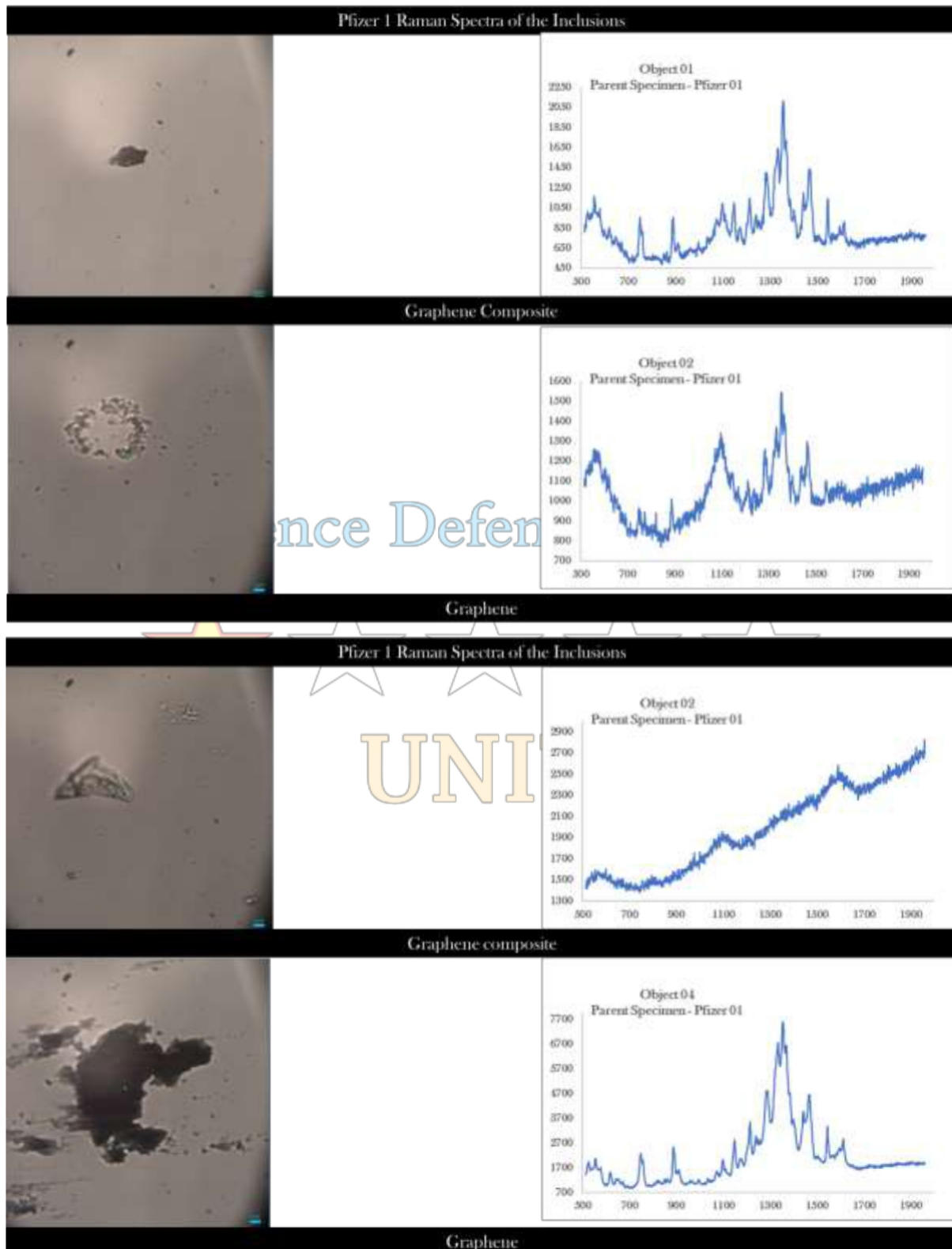


Figura 3.33. Espectros Raman de varias incusiones en AstraZéneca.



La espectrografía Raman se realizó sobre cuatro muestras representativas seleccionadas de Pfizer (figura 3.32). Tres de estas muestras reflejaron compuestos de carbono con posible grafeno en ellos.

Las señales de los materiales similares al carbono amorfo eran extremadamente complejas, con carbono junto con óxido de hierro y otros compuestos. El complejo de grafeno 1 es grafeno con señal de polietilenglicol que forma la mayor parte del espectro. Aunque, para las evaluaciones iniciales, este estudio puede confirmar la presencia de grafeno en Pfizer, sin embargo, el complejo con el que está asociado todavía requiere ser establecido a través de un trabajo adicional.

Una de las muestras fotografiadas presentaba una buena influencia de la fluorescencia. Es importante volver a fotografiar esta muestra con exposiciones más largas para separar la señal del objeto de interés de la señal del fondo.

En resumen, el Raman ayudó a identificar las inclusiones dentro de Pfizer y estas identificaciones se clasificaron en los recuentos.

3.5.3. Recuento

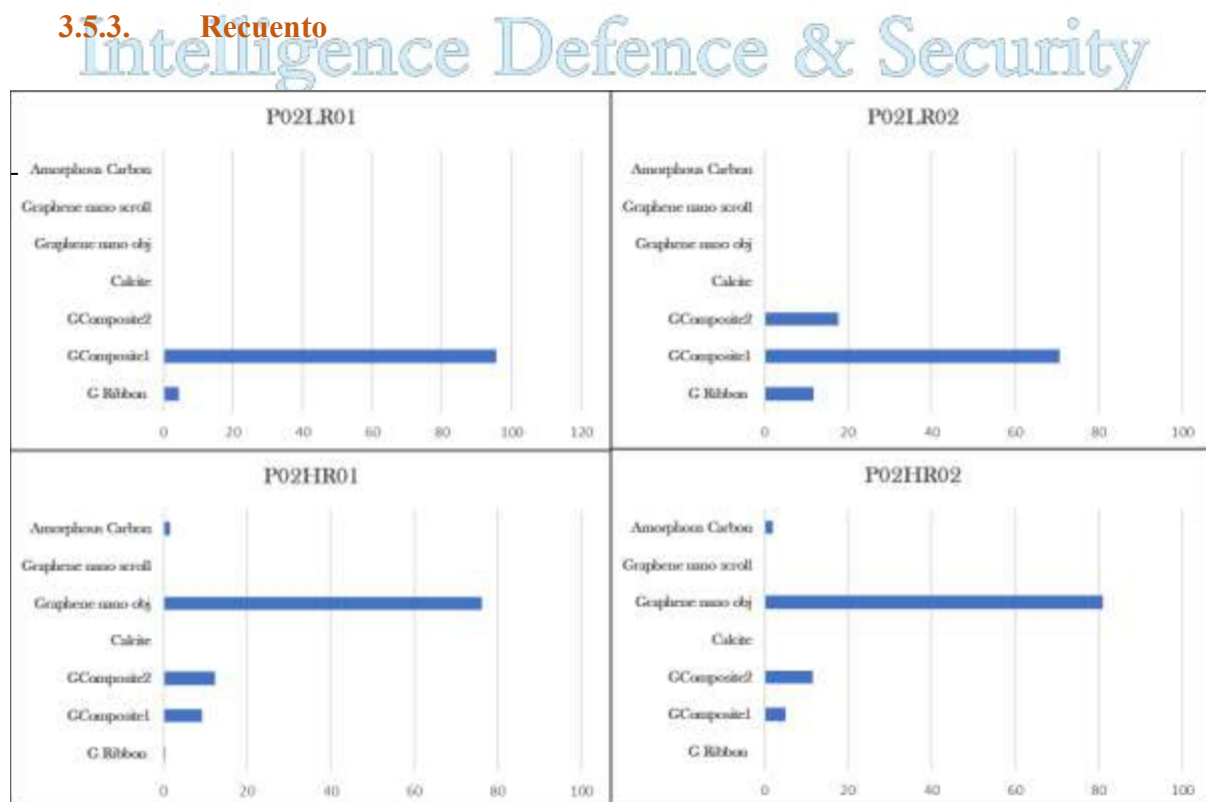


Figure 3.34. Hojas de recuento a baja y alta resolución a lo largo de dos pistas cada una para AstraZéneca

Los recuentos para Pfizer fueron tomados a lo largo de cuatro pistas de dos cada una para magnificaciones Bajas y Altas (figura 3.34). El número relativo de compuestos de carbono 2 es bastante alto en una de las pistas mientras que está completamente ausente en la primera pista. A magnificaciones más altas el recuento está dominado por el gran número de objetos de nano grafeno.



Global Humanitarian Crisis Prevention and Response Unit

Cabe señalar que en los recuentos se han omitido los nanorrollos de grafeno. Este paso fue necesario porque, aunque estos nanorrollos forman un porcentaje significativo de los recuentos totales, no se pudo lograr una confirmación de su composición dentro de las limitaciones de este proyecto. Como se menciona en el apartado 3.1.5, la investigación exhaustiva de estas formas constituye ahora el objeto de un segundo proyecto de investigación mejorado tras este informe.

Intelligence Defence & Security



UNIT



4. Interpretación, Discusiones y Conclusión

Moderna

Ingredientes Activos

- ARNm

Vehículos

- SM102
- Polietilenglicol
- 2000 dimiristoil glicerol (DMG)
- Colesterol
- 1,2-distearoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (DSPC) Ingredientes inactivos
- Trometamina
- Clorhidrato de trometamina
- Acido Acético
- Acetato de Sodio
- Sacarosa

AstraZeneca

Ingredientes Activos

- Adenovirus Vehicles
- L-histidina
- Clorhidrato de L-histidina monohidrato Ingredientes inactivos
- Cloruro de magnesio hexahidratado
- Polisorbato 80
- Etanol
- Sacarosa
- Cloruro de Sodio
- Edetato disódico dihidratado (EDTA)
- Agua

Pfizer

Ingredientes Activos

- ARNm

Vehículos

- 4-hidroxibutil azanediil bis hexano -6,1-diil bis 2 hexildecanoato
- Polietilenglicol
- N,N di tetra decilacetamida
- 1,2 di estearoil sn glicerol 3fosfocolina
- Colesterol
- Cloruro de Potasio
- Fosfato potásico monobásico
- Cloruro de sodio
- Sodio dibásico, fosfato deshidratado
- Sacarosa

Tabla 1

Lista de ingredientes declarados en las vacunas

Intelligence Defence & Security
UNIT



Los sujetos del estudio fueron cuatro muestras de vacunas (2 de Moderna, 1 de AstraZéneca y 1 de Pfizer). El objetivo de este estudio era examinar estos cuatro viales de vacunas y documentar cualquier ingrediente no declarado en la composición de las vacunas, con especial atención al grafeno y los productos relacionados, así como cualquier forma biológica.

Cabe señalar que las tres vacunas tienen ingredientes químicos muy diferentes según lo declarado por los fabricantes (Tabla 1). A pesar de esta diferencia genética entre ellas, al examinarlas, los resultados revelan inclusiones comunes no declaradas en los cuatro viales.

Estas inclusiones se centran principalmente en el grafeno y las nanoestructuras relacionadas con el carbono en forma de compuestos de carbono o grafeno, grafeno en asociación con polietilenglicol, óxido de grafeno, compuestos de óxido de hierro y calcita. La variación en las formas de las inclusiones registradas apunta a sus variados fines en el ámbito más amplio de la administración de fármacos y los campos biosensoriales.

Las formas identificadas en el curso de este proyecto pueden clasificarse en cinco categorías diferentes

1. Formas de cinta (G-PEG)
2. Formas de hoja (GC-1)
3. Formas tubulares (GC-2)
4. Nano Puntos
5. Nano Rollos

Mientras que las funciones de las cintas y las láminas siguen sin estar claras debido a sus tamaños microscópicos, las formas tubulares junto con los nano puntos y los rollos parecen tener como objetivo mejorar la aceptación del fármaco por parte de las células.

Las tres vacunas emplean comúnmente las nano partículas lipídicas autoensambladas como mecanismos de administración de fármacos. Si bien el hallazgo central de este proyecto ha sido la confirmación de la presencia de grafeno en las cuatro muestras, es importante evaluar este hallazgo en el contexto del propio tema.

Como se ha mencionado anteriormente, los procesos de autoensamblaje son los mecanismos centrales de entrega de los tres tipos de vacunas. Como se ha informado en las observaciones del capítulo 3, el proceso en sí mismo, depende principalmente de las interacciones intermoleculares débiles (Mendes et al. 2013) que, en el caso de las nanopartículas de lípidos es impulsado y determinado por la cinética y el entorno termodinámico. Sin embargo, según las observaciones de este estudio, para iniciar la nucleación o siembra de estas partículas en el primer estado, las nanopartículas de grafeno parecen desempeñar un papel importante. Esta



interpretación se desprende de la observación de que cada una de las nanopartículas parece tener un núcleo de grafeno formado por nano partículas que flotan al principio y luego se mueven antes de asentarse. Este proceso crea un defecto en el medio de la solución, facilitando así la formación de la semilla de nano partículas. Dada la alta concentración de nanoobjetos de grafeno en las cuatro vacunas, a medida que las nanopartículas se desplazan por el medio, deben ir incorporando no sólo nanodots de grafeno, sino también nanorrollos, aumentando así su eficacia de unión y su capacidad de carga.

Como ya se sabe, la estructura de la nanopartícula lipídica desempeña un papel crucial en la determinación de su eficacia para transportar la carga útil de ácido nucleico. Sin embargo, es la estructura de la carga útil la que define la geometría de las nanopartículas lipídicas (Hajj et al. 2019, Kulkarni et al. 2018).

Aunque estas estructuras pueden variar en función de la carga útil, las funciones principales de las nanopartículas lipídicas son las mismas: (1) protección de los ácidos nucleicos frente a las nucleasas, (2) liberación controlada de los ácidos nucleicos, (3) selectividad celular y tisular, (4) alto rendimiento de entrega, (5) mínima toxicidad y (6) estabilidad, especialmente en el almacenamiento a largo plazo. Estas características necesarias para un vector pueden mejorarse significativamente mediante el uso de nanotubos de carbono, grafeno y óxido de grafeno. Este proceso se observó en acción, cuando los experimentos se llevaron a cabo durante el curso de este estudio y como se informó en detalle en el capítulo 3.

Los nanotubos, tanto los de pared simple como los de pared múltiple, junto con las formas de grafeno, se están abriendo camino cada vez más en la administración selectiva de fármacos (Sattari et al. 2021, Wu et al. 2018, Wierzbicki 2017, Eatemadi et al. 2014). Las muestras evaluadas en el transcurso de este proyecto han identificado que el grafeno y otros compuestos de carbono forman una parte llamativa de los ingredientes de estas vacunas. Teniendo en cuenta el contexto del creciente uso del grafeno en la administración de fármacos, los resultados de este proyecto parecen encajar en el marco de referencia de los intentos de mejorar y adaptar la administración de fármacos.

El trabajo realizado hasta ahora ha sido esencialmente una evaluación cualitativa de los contenidos. Hay varias formas dentro de estas vacunas que requieren una evaluación y determinación cuantitativa. Uno de los principales obstáculos para lograr un buen resultado cuantitativo era la imposibilidad de aislar la fracción sólida. El método utilizado en este proyecto fue el tradicional de preparación de portaobjetos. Esperamos que, si se realizan trabajos similares en otras muestras, se adopte el filtrado al vacío como mecanismo para obtener muestras más limpias para la obtención de imágenes Raman y SEM.



Global Humanitarian Crisis Prevention and Response Unit

Además, es muy importante mencionar que la fuente de fluorescencia dentro de las muestras era desconocida mientras se realizaban las investigaciones Raman. Debido a los plazos extremadamente ajustados, no fue posible completar las repeticiones de Raman en las que se habrían eliminado los efectos de la fluorescencia mediante la emitancia dirigida y el procesamiento de los datos. A pesar de ello, las señales se interpretaron utilizando datos similares de varios catálogos. Es de esperar que se siga trabajando en las investigaciones espectroscópicas Raman para obtener espectros más limpios y aislar los espectros individuales de los especímenes actuales.

En conclusión, se puede afirmar que las cuatro muestras de vacunas (Moderna 1, Moderna 2, AstraZeneca, Pfizer) contienen una cantidad significativa de compuestos de carbono, compuestos de grafeno y óxido de hierro. Estos ingredientes no fueron declarados por los fabricantes y están ausentes de la lista de ingredientes de las vacunas.





5. Bibliografía

- Bonneville, S., Delpomdor, F., Preat, A., Chevallier, C., Arkaki, T., Kazemlan, M., Steele, A., Schrelber, A., Wirth, R., Benning, L.G. (2020). Molecular identification of fungi microfossils in a Neoproterozoic shale rock. *Palaeontology*, 6, 1-11.
- Buzgar, N. and Apopei, A. (2009). The Raman study of certain carbonates. *Analele stiintifice ale universitatii, al. i. cuza iasi. Geologie*. Tomul LV, 2.
- Brennan, T.V., Lin, L., Huang, X. and Yang, Y. (2018). Generation of Luciferase-expressing Tumor Cell Lines. *Bioprotocol*, 8(8), 1-1
- Childres, I., Jauregui, L.A., Park, W., Cao, H. and Chen, Y.P. Raman spectroscopy of Graphene and related materials. Chapter 19.
- Crystal, R.G. (2014). Adenovirus: The First Effective In Vivo Gene Delivery Vector. *Human Gene Therapy* 25,3-11.
- Das, A., Chakraborty, B. and Sood, A.K. (2008). Raman Spectroscopy of graphene on different substrates and influence of defects. *Bulletin of Material Sciences*, 31, 3, 579-584.
- Doerfler, W. (2021). Adenoviral Vector DNA- and SARS-CoV-2 mRNA-Based Covid-19 Vaccines: Possible Integration into the Human Genome – Are Adenoviral Genes Expressed in Vector-based Vaccines.
- Dychalska, A., Popielarski, P., Frankow, W., Fabisiak, K., Paprocki, K. and Szybowicz. (2015). Study of CVD diamond layers with amorphous carbon admixture by Raman scattering spectroscopy. *Materials Science-Poland*.
- Ghosh, S., Calizo, I., Teweldebrhan, D., Pokatilov, E.P., Nika, D.L., Balandin, A.A., Bao, W., Miao, F. and Lau, C.N. (2008). Extremely high thermal conductivity of graphene: Prospects for thermal management applications in nanoelectronic circuits. *Applied Physics Letters*, 92, 151911-1-3.
- Griffith, W.P. (1969). Raman spectroscopy of Minerals. *Nature*, 244, 264-266.
- Guo, W., Chen, Z., Feng, X., Shen, G., Huang, H., Liang, Y., Zhao, B., Lo, G. and Hu, Y. (2021). Graphene oxide (GO)-based nanosheets with combined chemo/photothermal/photodynamic therapy to overcome gastric cancer (GC) paclitaxel resistance by reducing mitochondria-derived adenosine-triphosphate (ATP).
- Haskin, L.A., Wang, A., Rockow, K.M., Jolliffe, B.L., Korotev, R.L. and Viskupic, K.M. (1997). Raman spectroscopy for mineral identification and quantification for in situ



planetary surface analysis: A point count method. *Journal of Geophysical Research*, 102, 8. 19293-19306.

- Hajj, A., Ball, R.L., Deluty, S.B., Singh, S.R., Strelkova, D., Knapp, C.M., Whitehead, K. (2019) Branched-tail lipid nanoparticles potently deliver mRNA in vivo due to enhanced ionization at endosomal pH. *Small*, 15, 1–7.
- Jiao, L., Zhang, L., Wang, X., Diankov, G. and Dai, H. (2009). Narrow graphene nanoribbons from carbon nanotubes. *Nature Letter*, 458, 877-880.
- Jiang, W., Liang, F., Wang, J., Su, L., Wu, Y and Wang, L. (2014). Enhanced electrochemical performances of FeO – graphene nanocomposite as anode materials for alkaline nickel-iron batteries. **RSC Adv.**, 2014, 4, 15394-15399.
- Kato, M., Guan, S. and Zhao, X. (2021). In-situ observation of graphene using an optical microscope. *Applied Surface Science Advances*, 6,
- Kim, J., Eygeris, Y., Gupta, M. and Sahay, G. (2021). Self-assembled mRNA vaccines. *Advanced Drug Delivery Review*, 170, 83-112.
- Kulkarni, A., Darjuan, M.M., Mercer, J.E., Chen, S., van der Meel, R., Thewalt, J.L., Tam, Y.Y.C., and Cullis, P.R. (2018). On the formation and morphology of lipid nanoparticles containing ionizable cationic lipids and siRNA. *ACS Nano*, 12, 4787– 4795.
- Kuzmin, V.V., Novikov, V.S., Ustynyuk, L.Y., Prokhorov, K.A., Sagitova, E.A. and Nikolaeva, G.Y. (2020). Raman Spectra of polyethylene glycols: Comparative experimental and DFT study. *Journal of Molecular Structure*, 1217, 5,
- Liu, J., Cui, L. and Losic, D. (2013). Graphene and Graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomaterialia*, 9(22).
- Malard, L.M., Pimenta, M.A., Dresselhaus, G., Dresselhaus, M.S. (2009). Raman spectroscopy in graphene. *Physics Reports*, 473, 51-87.
- Mendes, A.C., Baran, E.T., Reis, R.L. and Azevedo, H.S. (2013). Self-assembly in nature: Using the principles of nature to create complex nanobiomaterials. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol* 5, 582-612.
- Osvath, Z., Zambo, D., Sulyok, A., Palinkas, A. and Deak, A. 2021. Tuning the nanoparticle rippling of graphene with PEGylated gold nanoparticles and ion radiation. *Carbon Trends*, 5, 1-5.
- Paillard, V. (2001). On the origin of the 1100cm^{-1} Raman band in amorphous and nanocrystalline sp^3 carbon. *Europhysics Letters*, 54(2), 194-198.



Global Humanitarian Crisis Prevention and Response Unit

- Pierna, J.A.F., Abbas, O., Dardenne, P. and Baeten, V. (2011). Discrimination of Corsican honey by FT-Raman spectroscopy and chemometrics. *Biotechnological Agron. Society Environment*, 15,1, 75-84.
- Pop, E., Varshney, V., Roy, A. (2012). Thermal properties of graphene: Fundamentals and applications. *MRS Bulletin* 37, 1273-1281
- Praver, S. and Nemanich, R.J. (2004). Raman Spectroscopy of diamond and doped diamond. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A. Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 362, 2537- 2565.
- Romann, J., Valmalette, J.C., Chevallier, V. and Merlen, A. (2010). Surface interactions between molecules and nanocrystals in copper oxalate nanostructures. *Journal of Physical Chemistry, C*. 114, 10677-19682.
- Roy, S. and Jaiswal, A. (2017). Graphene-based nanomaterials for theranostic applications. *Reports in Advances of Physical Sciences*, 1,4, 53pp.
- Sagitova, E.A., Prokhorov, K.A., Nikolaeva, G.Y., Baimova, A.V., Pashinin, P.P., Yarysheva, A.Y. and Mendelev, D.I. (2018). Raman analysis of polyethylene glycols and polyethylene oxides. *Journal of Physics Conference Series*. 999 012002, 1-10.
- Sharma, S.K., Misra, A.K., Ismail, S. and Singh, U.N. (2006). Remote Raman Spectroscopy of Various Mixed and Composite Mineral Phases at 7.2m Distance. <https://www.researchgate.net/publication/252521525>.
- Tallant, D.R., Friedmann, T.A., Missert, N.A., Siegal, M.P. and Sullivan, J.P. (1998). Raman spectroscopy of amorphous carbon. *Material Research Society Symposium Proceedings*, 498, 37-47.
- Zhao, X., Liu, L., Li, X., Zeng, J., Jia, X. and Liu P. (2014). Biocompatible graphene oxide nanoparticle-based drug delivery platform for tumor microenvironment-responsive triggered release of doxorubicin. *Langmuir*, 30(34),
- Wierzbicki, M., Jaworski, S., Kutwin, M., Grodzik, M., Strojny, B., Kurantowicz, N., Zdunek, K., Chodun, R., Chwalibog, A., Sawosz, E. (2017). Diamond, graphite and graphene oxide nanoparticles decrease migration and invasiveness in glioblastoma celllines by impairing extracellular adhesion. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 7241-7254.
- Wu, J., Phillips, J.A., Liu, H. and Tan, Y.W. (2008). Carbon nanotubes protect DNA strands during cellular delivery. *ACS Nano*. 2 (2008) 2023-2028.



Global Humanitarian Crisis Prevention and Response Unit

- Xie, W., Xu, G. and Feng, X. (2012). Self-assembly of lipid nano particles in aqueous solution; Self-consistent field simulations. Theoretical and Applied Mechanics Letters, 2, 014004, 1-5.
- Yong Tai, M.J., Perumal, V., Gopinath, S.C.B., Raja, P.B., Ibrahim M.N.M., Jantan, I.N., Suhaimi, N.S.H. and Liu, W.W. (2021). Laser-scribed graphene nanofiber decorated with oil palm lignin capped silver nanoparticles: a green biosensor. Scientific Reports, 11,5475.

Intelligence Defence & Security



Toxicidad de nanopartículas de la familia del grafeno: una revisión general de los orígenes y mecanismos

Lingling Ou², Bin Song¹, Huimin Liang¹, Jia Liu¹, Xiaoli Feng¹, Bin Deng³, Ting Sun² and Longquan Shao^{1*}

Introducción

Debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas, los nanomateriales de la familia del grafeno (GFNs) se utilizan ampliamente en muchos campos, especialmente en aplicaciones biomédicas. Actualmente, muchos estudios han investigado la biocompatibilidad y la toxicidad de los GFNs in vivo y in vitro. En general, los GFNs pueden ejercer diferentes grados de toxicidad en animales o modelos celulares siguiendo diferentes rutas de administración y penetrando a través de barreras fisiológicas, siendo posteriormente distribuidos en tejidos o ubicados en células, y finalmente siendo excretados del cuerpo. Esta revisión recopila estudios sobre los efectos tóxicos de los GFNs en varios órganos y modelos celulares. También señalamos que varios factores determinan la toxicidad de los GFNs, incluyendo el tamaño lateral, la estructura de superficie, la funcionalización, la carga, las impurezas, las agregaciones y el efecto corona, etc. Además, varios mecanismos subyacentes a la toxicidad de GFN se han revelado, por ejemplo, destrucción física, estrés oxidativo, daño al ADN, respuesta inflamatoria, apoptosis, autofagia y necrosis. En estos mecanismos, vías dependientes de los receptores (tipo peaje-) TLR-, del factor de crecimiento transformador β - (TGF- β -) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) están involucrados en la red de señalización, y el estrés oxidativo juega un papel crucial en estas vías. En esta revisión, resumimos la información disponible sobre los factores reguladores y los mecanismos de toxicidad de los GFNs, y proponemos algunos desafíos y sugerencias para futuras investigaciones de los GFNs, con el objetivo de completar los mecanismos toxicológicos y proporcionar sugerencias para mejorar la seguridad biológica de los GFNs y facilitar su amplia aplicación.

Palabras clave: Nanomateriales de la familia del grafeno, Toxicidad, Toxicocinética, Mecanismos, Propiedades fisicoquímicas, Perspectivas futuras

Marco Teórico

El grafeno, que se aísla del grafito cristalino, es una monocapa plana compuesta por láminas bidimensionales de un solo átomo de espesor, que se organiza como hojas hexagonales dispuestas en red como un panel de abejas [1]. Debido a sus características estructurales únicas, especificidades de superficie y mecánicas, las funciones y aplicaciones del grafeno han ganado considerable atención desde el descubrimiento del material en 2004 [2, 3]. El grafeno y sus derivados incluyen grafeno en monocapa, grafeno de pocas capas (FLG), óxido de grafeno (GO), óxido de grafeno reducido (rGO), nanohojas de grafeno (GNS) y nanocintas de grafeno, etc. [4-7]. GO es uno de los más vitales derivados químicos de grafeno, entre los nanomateriales de la familia del grafeno (GFNs), que

atrae cada vez más atención por sus posibles aplicaciones biomédicas. Los materiales a base de grafeno suelen tener tamaños que van desde varios a cientos de nanómetros y tienen un grosor de 1-10 nm [8, 9], que también es la definición de "nanopículas" o "nanomateriales". Debido a sus propiedades físicas y químicas excepcionales, los materiales de grafeno se han utilizado ampliamente en varios campos, incluido almacenamiento de energía; dispositivos nanoelectrónicos; baterías [10-12]; y aplicaciones biomédicas, como sustancias antibacterianas [13, 14], biosensores [15-18], imágenes celulares [19, 20], administración de medicamentos [8, 21, 22] e ingeniería de [23-25]. Junto con el aumento de la aplicación y producción, el riesgo de exposición ocupacional o ambiental, no intencional, a los GFNs está aumentando [26]. Y recientemente, hay algunas investigaciones sobre la exposición a los GFNs en entornos ocupacionales y los datos publicados mostraron que

la exposición ocupacional a los GFNs tenía potencial tóxico para los trabajadores e investigadores [27-29]. Los GFNs se pueden administrar en los cuerpos mediante instilación intratraqueal [30], administración oral [31], inyección intravenosa [32], inyección intraperitoneal [33] e inyección subcutánea [34]. Los GFNs pueden inducir lesiones agudas y crónicas en los tejidos penetrando a través de la barrera sangre-aire, barrera sangre-testículos, barrera hematoencefálica, barrera sangre-placenta etc., acumulándose en los pulmones, hígado, bazo, etc. Por ejemplo, algunos aerosoles de nanomateriales de grafeno pueden ser inhalados y depositados sustancialmente en las vías respiratorias, y pueden penetrar fácilmente a través de las vías traqueobronquiales y luego transitar hasta las vías respiratorias pulmonares inferiores, lo que resulta en formación secundaria de granulomas, fibrosis pulmonar y efectos adversos en la salud de personas expuestas. Varias revisiones han esbozado las propiedades únicas [35, 36] y han resumido las nuevas aplicaciones biológicas y potenciales de los GFNs para la administración de fármacos, administración de genes, biosensores, ingeniería tisular y neurocirugía [37-39]; han evaluado la biocompatibilidad de GFNs en células (bacterianas, mamíferos y vegetales) [7, 40, 41] y en animales (ratones y pez cebra) [42]; han recopilado información sobre la influencia de GFNs en el suelo y los entornos acuáticos [43]. Aunque estas revisiones discutieron los perfiles de seguridad y la nanotoxicología de GFNs, las conclusiones específicas y los mecanismos detallados de toxicidad fueron insuficientes, y los mecanismos de toxicidad no se resumieron por completo. Los mecanismos toxicológicos de GFNs demostrados en estudios recientes contienen principalmente respuesta inflamatoria, daño al ADN, apoptosis, autofagia y necrosis, etc., y esos mecanismos se pueden recopilar para explorar más a fondo la compleja red de vías de señalización que regula la toxicidad de los GFNs. Debe señalarse que hay varios factores que influyen en gran medida en la toxicidad de los GFNs, como concentración, dimensión lateral, estructura de superficie y funcionalización, etc. Por lo tanto, esta revisión presenta un resumen exhaustivo de la información disponible sobre los mecanismos y los factores reguladores de la toxicidad de GFNs *in vitro* e *in vivo* a través de diferentes métodos experimentales, con el objetivo de proporcionar sugerencias para nuevos estudios de GFNs y completar los mecanismos toxicológicos para mejorar la seguridad biológica de GFNs y facilitar su amplia aplicación.

Toxicidad de GFNs (*in vivo* e *in vitro*)

Los GFNs penetran a través de las barreras fisiológicas o las estructuras celulares por diferentes formas de exposición o vías de admisión y entran en el cuerpo o en las células, lo que finalmente resulta en toxicidad *in vivo* e *in vitro*. Las diferentes rutas de administración y vías de entrada, diferente distribución y excreción tisular, incluso los diversos patrones y ubicaciones de absorción celular, pueden determinar el grado de

toxicidad de GFNs [44-46]. Por lo tanto, puede ser útil comprender mejor las leyes de existencia y desarrollo de la toxicidad de GFNs.

Vías de Administración

Las vías de administración comunes en los modelos animales incluyen la exposición por vías respiratorias (insuflación intranasal, instilación intratraqueal e inhalación), administración oral, inyección intravenosa, inyección intraperitoneal e inyección subcutánea. La principal vía de exposición a los GFNs en el entorno de trabajo es la exposición por las vías respiratorias, por lo que la inhalación y la instilación intratraqueal se utilizan principalmente en ratones para simular la exposición humana a los GFNs. Aunque el método de inhalación proporciona una simulación más realista de la exposición en la vida real, instilación es un método más efectivo y ahorra tiempo, y se encontró que los GFNs causan un período de inflamación más largo utilizando instilación (instilación intratraqueal, instalación intrapleural y aspiración faríngea) do que utilizando inhalación [24, 30, 47, 48]. Los GFNs fueron investigados para depositarse en los pulmones y acumularse a un nivel alto, y se retuvo durante más de 3 meses en los pulmones con una eliminación lenta después de la instilación intratraqueal [49]. También se utiliza inyección intravenosa ampliamente para evaluar la toxicidad de los nanomateriales de grafeno, y el grafeno circula por el cuerpo de los ratones en 30 minutos, acumulándose a una concentración de trabajo en el hígado y la vejiga [32, 50-52]. Sin embargo, los derivados de GO tuvieron una adsorción intestinal bastante finita y se excretaron rápidamente en ratones adultos mediante administración oral [31, 53]. El GO de tamaño nanométrico (350 nm) hizo que menos células mononucleares se infiltraran en el tejido adiposo subcutáneo después de la inyección subcutánea en la región del cuello en comparación con GO del tamaño micrométrico (2 μ m) [34]. GO se aglomeró cerca del lugar de inyección después de inyección intraperitoneal, y numerosos agregados más pequeños se asentaron en las proximidades de la serosa hepática y del bazo [31, 33]. No se encontraron experimentos sobre el contacto o la penetración cutánea de GFNs en los documentos revisados aquí, y no hay suficiente evidencia disponible para concluir que el grafeno pueda penetrar en lesiones cutáneas o piel intacta. La ruta de las gotas nasales, que se ha utilizado ampliamente para probar la neurotoxicidad o el potencial de lesión cerebral de otros nanomateriales, no se mencionó en los documentos revisados aquí.

Rutas de entrada de GFNs

Los GFNs llegan a varios lugares a través de la circulación sanguínea o barreras biológicas después de entrar en el cuerpo, lo que resulta en diversos grados de retención en diferentes órganos. Debido a su tamaño nanométrico, los GFNs pueden llegar a órganos más profundos al pasar a través de las barreras fisiológicas normales, como la barrera sangre-aire, la barrera sangre-testículos, la barrera hematoencefálica y la barrera placentaria.

Barrera sangre-aire

Los pulmones son una posible entrada de nanopartículas de grafeno en el cuerpo humano a través de las vías respiratorias. Las nanohojas de GO inhaladas pueden destruir la ultraestructura y las propiedades biofísicas de la película del tensioactivo pulmonar (PS), que es la primera línea de defensa del huésped, emergiendo su toxicidad potencial [54]. Las partículas aglomeradas o dispersas se depositan en la superficie alveolar interna dentro de los alvéolos y luego son absorbidas por macrófagos alveolares (AMs) [55]. La limpieza en los pulmones es facilitada por la escalera mecánica mucociliar, las AMs o la capa epitelial [56-58]. Sin embargo, una vez inhaladas algunas nanopartículas pequeñas se infiltran en la barrera epitelial pulmonar intacta y luego pueden entrar transitoriamente en el epitelio alveolar o en el intersticio [59, 60]. El grafeno instilado intratraquealmente puede redistribuirse al hígado y al bazo pasando a través de la barrera sangre-aire [61]. El estudio de la barrera sangre-aire puede llamar intensamente la atención, ya que los investigadores y trabajadores se exponen ocupacionalmente a GFNs generalmente a través de inhalación. El dejar claro el papel que la barrera sangre-aire desempeña en la toxicidad de GFNs puede convertirse en un tema candente de investigación.

Barrera hematoencefálica

La intrincada disposición de la barrera hematoencefálica, que consiste en varios receptores de membrana y transportadores altamente selectivos, solo ejerce una influencia sutil en la circulación sanguínea y en el microambiente cerebral en relación con el endotelio vascular periférico [62]. Investigaciones sobre los mecanismos de la barrera hematoencefálica había hecho algún progreso relacionado con enfermedades y nanotoxicidad. Las imágenes de espectrometría de masas (MSI) por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) revelaron que rGO, con un diámetro promedio de $342 \pm 23,5$ nm, se impregna a través de la vía paracelular hacia la hendidura interendotelial de manera dependiente del tiempo al disminuir la tensión paracelular de la barrera hematoencefálica [63]. Además, los puntos cuánticos de grafeno (GQDs), con un tamaño pequeño de menos de 100 nm, pueden cruzar la barrera hematoencefálica [64]. Estudios sobre cómo los materiales de grafeno pasan a través de la barrera hematoencefálica y causan neurotoxicidad son muy raros, y se necesitan más datos para sacar una conclusión.

Barrera sangre-testículos

Las barreras sangre-testículos y sangre-epidídimo son bien conocidas por estar entre las barreras sangre-tejido más estrechas del cuerpo de los mamíferos [65]. Partículas de GO con diámetros de $54,9 \pm 23,1$ nm tuvieron dificultades para penetrar en las barreras sangre-testículos y sangre-epidídimo después de inyección intraabdominal, y la calidad del esperma de los ratones no se vio obviamente afectada ni siquiera a una dosis de 300 mg/kg [66].

Barrera sangre-placenta

La barrera placentaria es indispensable para mantener el embarazo, ya que media el intercambio de nutrientes y desecho de productos metabólicos, ejerce funciones metabólicas vitales y secreta hormonas [67]. Una revisión reciente sugirió que la placenta no proporciona una barrera estricta contra la transferencia de nanopartículas a los fetos, específicamente contra la distribución de nanopartículas carbonosas hacia y en el feto [42]. Se sugirió que rGO y las partículas de oro (diámetro de 13 nm) apenas están presentes o están ausentes en la placenta y en el feto a finales de la gestación después de inyección intravenosa [44, 68]. Sin embargo, otros informes mostraron que el transfer transplacentario se produce en etapas gestacionales tardías [69, 70]. Se ha puesto mucha atención a la toxicidad de nanomateriales en el desarrollo, e informes mostraron que muchas nanopartículas cruzaban la barrera placentaria e influían fuertemente en el desarrollo de embriones [71-75]. Pero estudios de la exposición a materiales de grafeno a través de la barrera placentaria son deficientes, y la forma en que estas partículas se transfieren a embriones debe evaluarse en detalle en el futuro.

Estas cuatro barreras eran las más frecuentemente mencionadas en la literatura, y otras no se han evaluado en estudios recientes, como las barreras cutáneas, que no se han mencionado en ninguno de los cientos de estudios de toxicidad GFNs buscados. Además, no se entiende bien los mecanismos por los cuales los GFNs pasan a través de estas barreras, y se necesitan más investigaciones sistemáticas urgentemente.

Distribución y excreción de GFNs en los tejidos

La absorción, distribución y excreción de nanopartículas de grafeno pueden verse afectadas por varios factores, incluidas las rutas de administración, las propiedades fisicoquímicas, la aglomeración de partículas y el recubrimiento superficial de GFNs.

Las diferentes vías de administración influyen en la distribución de GFNs, por ejemplo, la FLG instilada intratraquealmente, pasando a través de la barrera sangre-aire, principalmente se acumuló y se retuvo en los pulmones, con un 47 % restante después de 4 semanas [61]. El GO administrado por vía intravenosa entró en el cuerpo a través de la circulación sanguínea y se retuvo en gran medida en los pulmones, hígado, bazo y médula ósea, y se observó infiltración de células inflamatorias, formación de granulomas y edema pulmonar en los pulmones de ratones después de una inyección intravenosa de 10 mg/Kg peso corporal GO [49]. Del mismo modo, se observó una alta acumulación de derivados de PEGylated GO en el sistema reticuloendotelial (RES), incluidos el hígado y el bazo, después de inyección intraperitoneal. Por el contrario, GO-PEG y FLG no mostraron absorción detectable en el tracto gastrointestinal ni absorción en el tejido mediante administración oral [31].

Las diferentes propiedades de GFNs, como su tamaño, dosis y grupos funcionales, siempre conducen a resultados inconsistentes

en los perfiles de distribución del grafeno. Por ejemplo, Zhang et al. encontraron que GO estaba principalmente atrapado en los pulmones de ratones [49]; sin embargo, Li et al. observaron que el GO se acumulaba en el hígado de ratones [76]. En particular, las pequeñas hojas de GO, con diámetros de 10-30 nm, se distribuían principalmente en el hígado y bazo, mientras que las hojas de GO más grandes (10-800 nm) se acumulaban principalmente en los pulmones [49, 52, 77]. Si el tamaño de GO es mayor que el tamaño de los vasos, el GO generalmente se queda atascado en las arterias y capilares en las proximidades del lugar de la inyección. Se demostró que la acumulación de GO en los pulmones aumentaba con el aumento de la dosis y el tamaño inyectados, pero eso en el hígado disminuía significativamente [78]. El recubrimiento de GO con polímeros biocompatibles también afecta a la biodistribución, por ejemplo, la inyección intravenosa de GO-PEG y GO-dextran (GO-DEX) acumulan en el sistema reticuloendotelial (RES), incluidos el hígado y el bazo, sin toxicidad a corto plazo [31, 79]. Además, la carga de proteínas plasmáticas y la difusión de GO por proteínas plasmáticas también afectan la biodistribución [34].

La excreción y el aclaramiento de los GFNs varían en diferentes órganos. En los pulmones, observaciones indicaron que NGO son atraídas y eliminadas por las AMs, las cuales podrían eliminarse en el esputo a través del aclaramiento mucociliar u otras formas [57], y el 46,2 % del FLG instilado intratraquealmente se excretó a través de las heces 28 d después de la exposición [61]. En el hígado, las nanopartículas se pueden eliminar a través de la vía hepatobiliar siguiendo el conducto biliar hasta el duodeno [80]. Además, PEGy-lated GNS que se acumula principalmente en el hígado y bazo puede ser eliminado gradualmente, probablemente por excreción renal y fecal. Como se revisó recientemente, hojas de GO de más de 200 nm son atrapadas por la filtración física esplénica, pero las de tamaños pequeños (aproximadamente 8 nm) pueden penetrar los túbulos renales y en la orina eliminarse rápidamente sin toxicidad obvia [81]. Las rutas de excreción de GFNs aún no han sido explicadas claramente, pero las rutas renales y fecales parecen ser las principales vías de eliminación del grafeno.

Recientemente, las estrategias de distribución y excreción/toxicidad se han convertido en una parte importante en los estudios nanotoxicológicos. Hasta la fecha, se han reportado varios resultados controvertidos con respecto a la distribución y excreción de grafeno in vivo en varios artículos, y todavía se necesita una evaluación sistemática de la toxicocinética de los GFNs. El metabolismo y la excreción de nanomateriales son procesos de largo período, sin embargo, los estudios recientes de GFNs se han limitado a evaluaciones toxicológicas a corto plazo, y la acumulación y toxicidad a largo plazo de GFNs en diferentes tejidos siguen siendo desconocidas. Por lo tanto, es necesario realizar estudios a largo plazo sobre la deposición y excreción de GFNs utilizando diferentes células y animales para garantizar la bioseguridad de los materiales antes de su utilización en aplicaciones biomédicas en humanos.

Absorción y localización de los GFNs en las células También se ha observado que la absorción y la ubicación de GFNs ejercen diferentes efectos en diferentes líneas celulares. El grafeno es absorbido en las células por varias vías [82, 83]. Básicamente, los parámetros fisicoquímicos como tamaño, forma, revestimiento, carga, diámetro hidrodinámico, punto isoelectrico y gradiente de pH son importantes para permitir que GO pase a través de la membrana celular [84]. Como se indicó anteriormente, las nanopartículas con diámetros <100 nm pueden entrar en las células, y aquellas con diámetros <40 nm pueden entrar en el núcleo [85]. Por ejemplo, es posible que QGDs penetren las membranas celulares directamente, en lugar de a través de vías dependientes de la energía [86, 87]. Las nanopartículas de óxido de grafeno recubiertas por proteínas grandes (PCGO) (~1 µm) entran en las células principalmente a través de fagocitosis, y las nanopartículas PCGO más pequeñas (~500 nm) entran en las células principalmente a través de la endocitosis mediada por clatrin [88]. Las hojas de GO podrían adherirse y envolverse alrededor de la membrana celular, insertarse en la bicapa lipídica o internalizarse en la célula como consecuencia de interacciones celulares [89]. Del mismo modo, se demostró que el óxido de grafeno reducido PEGylado (PrGO) y rGO se adhieren a la bicapa lipídica de la membrana celular de forma prominente debido a interacción de dominios hidrófobos no modificados de grafitos con la membrana celular [90, 91]. En consecuencia, se sugirió que la exposición prolongada o a una alta concentración de grafeno induce daño físico o biológico a la membrana celular, junto con la desestabilización de los filamentos de actina y del citoesqueleto [92].

Los datos actuales demuestran que las hojas de GO interactúan con la membrana plasmática y son fagocitadas por macrófagos. Tres receptores principales de los macrófagos participan en la fagocitosis del GNS: el receptor Fcg (FcγR), el receptor manose (MR) y el receptor del complemento (CR). Además, FcγR es un receptor clave en la vía mediada por fagocitosis [90, 93, 94]. La proteína corona de GO promueve el reconocimiento por parte de los receptores de macrófagos, especialmente el IgG contenido dentro de la proteína corona. Se observó que los macrófagos sufrían cambios morfológicos prodigiosos al entrar en contacto con GO [34]. Después de la internalización, grafeno se acumuló en el citoplasma celular, en el espacio perinuclear y en el núcleo, lo que indujo citotoxicidad en los macrófagos murinos al aumentar el ROS intracelular a través del agotamiento del potencial de la membrana mitocondrial y al desencadenar la apoptosis a través de vías mitocondriales. [83]. Las posibles interacciones y sitios de acumulación de GFNs se resumen en la Fig. 1.

Toxicidad de GFNs en los órganos

La toxicidad y biocompatibilidad de GFNs se ha observado y evaluado a través de estudios teóricos y de modelos animales. En la actualidad, hay una masa de datos que muestran la toxicidad de GFNs en diferentes órganos o sistemas en animales, por lo que es difícil enumerar todos los datos

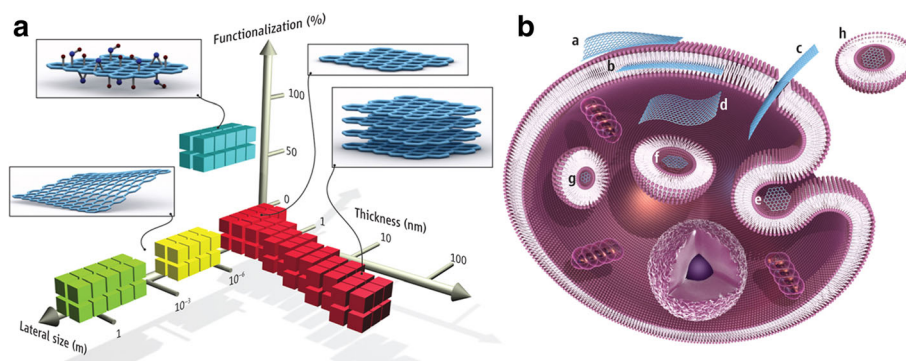


Fig. 1 Materiales de grafeno y sus interacciones biológicas. (A) Un rango de parámetros para los materiales de grafeno más utilizados se puede describir por las dimensiones y la funcionalización de la superficie del material, esta última definida como el porcentaje de átomos de carbono en hibridación sp^3 . Los cuadrados verdes representan grafeno cultivado epitaxialmente; los amarillos, grafeno exfoliado mecánicamente; los rojos, grafeno exfoliado químicamente; los azules, óxido de grafeno. Tenga en cuenta que otros materiales relacionados con el grafeno (como los puntos cuánticos de grafeno y las nanocintas de grafeno) también están siendo utilizados en experimentos. (B) Posibles interacciones entre los materiales relacionados con el grafeno y las células (los copos de grafeno no son a escala). (a) Adhesión a la superficie exterior de la membrana celular. (b) Incorporación entre las monocapas de la bicapa lipídica de la membrana plasmática. (c) Translocación de la membrana. (d) Internación citoplasmática. (e) Endocitosis mediada por clatrina. (f) Internalización endosomal o fagosome. (g) Compartimentalización perinuclear, lisosomal u otra. (h) Localización exosomal. Los resultados biológicos de dichas interacciones pueden considerarse adversos o beneficiosos, dependiendo del contexto de la aplicación biomédica en particular. Los diferentes materiales relacionados con el grafeno tendrán diferentes mecanismos preferenciales de interacción con células y tejidos que en gran medida esperan su descubrimiento. [90] Derechos de autor (2014), con permiso de la Asociación Americana para el Avance de la Ciencia

en esta revisión. Por lo tanto, resumimos un cierto número de literatura y elegimos algunos estudios toxicológicos in vivo de los GFNs enumerados en la Tabla 1.

Toxicidad en los órganos internos

GO puede provocar respuesta inflamatoria aguda y lesión crónica al interferir con las funciones fisiológicas normales de órganos importantes [32, 81]. Los experimentos con sonda oral no mostraron absorción detectable de GO a través del tracto gastrointestinal [95]. Interesante, una dosis baja de GO causó graves daños en el tracto gastrointestinal después de que los ratones maternos bebieran una suspensión de GO en lugar de una dosis alta de GO porque una dosis baja de GO sin aglomeración puede adherirse fácilmente a la superficie gastrointestinal y causar destrucción a través de sus abundantes bordes afilados [53]. GFNs causaron inflamación y permanecieron en los pulmones en el día 90 después de una sola instilación intratraqueal, e incluso se translocaron a los ganglios linfáticos pulmonares mediante una inhalación por nariz solamente [96, 97]. Una dosis alta de GO que forma agregaciones puede bloquear los vasos sanguíneos pulmonares y dar lugar a disnea [50, 98], y se observaron trombos plaquetarios a altas concentraciones de 1 y 2 mg/kg de peso corporal mediante inyección intravenosa [89]. Según se informa, GO interrumpió la barrera capilar-alveolar, permitiendo que células inflamatorias se infiltrasen en los pulmones y estimulasen la liberación de citocinas proinflamatorias [99]. Se pudo verificar fibrosis y inflamación mediante el aumento de los niveles de los marcadores proteicos colágeno1, Gr1, CD68 y CD11b en los pulmones. Se sugirió el uso de Tween 80 para dispersar FLG o un tensioactivo plurónico para dispersar el grafeno

y reducir la probabilidad de acumulación de fibrosis pulmonar en células o ratones, mientras que fibrosis pulmonar fué observada cuando se suspendió grafeno con albúmina sérica bovina (ASB) [100]. Además, se pueden administrar isótopos radiactivos a los pulmones, acompañados de una distribución profunda de ^{125}I -NGO en los pulmones, y los isótopos podrían depositarse allí y dar lugar a mutaciones y cánceres [30]. Sin embargo, publicaciones recientes afirmaron que no hay cambios patológicos obvios en ratones expuestos a dosis bajas de GO y grafeno funcionalizado por inyección intravenosa, incluyendo GO aminado (GO-NH₂), GO poli(acrilamida)-funcionalizado (GO-PAM), GO poli(ácido acrílico)-funcionalizado (GO-PAA) y GO-PEG; solo GO-PEG y GO-PAA indujeron menos toxicidad que el GO pristino in vivo [31, 79, 89]. Por lo tanto, los grupos funcionales de los GFNs y la concentración de trabajo o el estado agregado influyen en gran medida en la toxicidad de los GFNs. Recientemente, las formas de modificar el grupo funcional de GFNs, disminuir la concentración de trabajo o cambiar la condición agregada se utilizan generalmente para disminuir la toxicidad de los GFNs.

Toxicidad en el sistema nervioso central

El grafeno ha beneficiado en gran medida a neurocirugía con aplicaciones como administración de fármacos/genes en el tratamiento de tumores cerebrales, dispositivos biocompatibles intracraneales y espinales, técnicas de biodetección y bioimagen. Han surgido estudios sobre las potencialidades o los riesgos del grafeno en el cerebro. En el modelo con embrión de pollo, copos de grafeno pristino disminuyeron el nivel de ácido ribonucleico y la tasa de síntesis de ácido desoxirribonucleico, lo que llevó a

Tabla 1 Toxicidad de GFNs en órganos

Nanomateriales de la familia del grafeno	Propiedades fisicoquímicas y funcionalización	Animales	Dose y tiempo de incubación	Efectos	Referencia
Óxido de grafeno a nanoescala (NGO)	Sin información	Ratones C57BL/6	0, 1, 5, 10 mg/kg, instilación intratraqueal 0 h, 24 h, 48 h, 72 h y 1 semana	Resultó en lesión pulmonar aguda (ALI) y fibrosis pulmonar crónica	[30]
Grafeno de pocas capas (FLG)	Sin información	ratones ICR	0,1 o 1 mg/ml, sonda oral o instilación intratraqueal 3 o 28 días	FLG instilado por vía intratraqueal resultó en lesión pulmonar aguda y edema pulmonar, FLG no mostró absorción detectable a través del tracto gastrointestinal por sonda oral.	[61]
Plaquetas de grafeno (GPs)	Sin información	Ratones	exposición por inhalación, 1 día-6 semanas	GP causó inflamación aguda en el pulmón en 1 día y alivió la inflamación en el pulmón después de 6 semanas	[48]
Nanoplaquetas de grafeno (GPs)	Grosor de 10 nm Tamaño de 5–30 µm	Hembra C57BL/6 cepa de ratones	50 µg por ratón, aspiración faríngea o instalación intrapleural, 24 h- 7 días	Los GP grandes fueron inflamatorios tanto en el pulmón como en el espacio pleural.	[24]
GO	Grosor de 0,93 nm Tamaño de 150–250 nm	Ratas Sprague-Dawleys	0,5 o 4 mg/m3, exposición por inhalación, solo 6 horas	Exposición única a GO por inhalación indujo respuestas tóxicas mínimas en pulmones de rata	[235]
GO	Espesor de 0,9 nm tamaño de l-GO: 1–5 µm tamaño de s-GO: 100–500 nm	Ratones ICR macho	1,0 mg / kg, inyectados por vía intravenosa, 24 h	Se acumula principalmente en el hígado y los pulmones.	[78]
GO	Espesor de < 4 nm tamaño de l-GO: 237,9 ± 79,3 nm; tamaño de s-GO: 54,9 ± 23,1 nm	Macho y hembra Ratones de cepa ICR	24 mg/kg, inyección en la vena de la cola, 5 días	No afectó el número de cachorros, proporción de sexos, pesos, tasas de supervivencia o crecimiento, baja toxicidad para la reproducción masculina	[66]
GO	Espesor de ~1,0 nm tamaños de 10–800 nm	Ratones de Kunming	1,10 mg/kg, inyección intravenosa 14 días	Condujo a alta acumulación, retención a largo plazo, edema pulmonar y formación de granulomas	[49]
NGO-PEG	Espesor de 1 nm tamaño de 10–800 nm	Ratones Kunming machos	5 mg/kg, cola inyección intravenosa 10 min-24 h	NGO-PEG alivió lesiones tisulares agudas, disminuyó la pérdida de peso temprana	[81]
GO GO-PEG RGO--PEG nRGO-PEG	Espesor de 0,94, 1,22, 4,43 y 5,66 nm, tamaño de 450, 25, 50 y 27 nm	Ratones balb/c	4 mg/kg, inyección intraperitoneal 1, 7 y 30 días	Se acumuló en el sistema reticuloendotelial (RES), incluidos el hígado y el bazo, durante mucho tiempo	[31]
GO Puntos cuánticos de grafeno (GQD)	Espesor de GO, GQD: 0.5–1 nm tamaño de GO,GQD: 3–5 nm	Ratones balb/c	20 mg/kg inyección intravenosa o inyección intraperitoneal 14 días	GO pareció tóxico y causó muerte GQD reveló acumulación en órganos y causó baja citotoxicidad	[176]
Óxido de grafeno purificado (pGO)	Espesor de 1 a 2 nm, dimensión lateral de 100 a 500 nm	Ratones hembra C57BL/6	50 µg/animal, inyección intraperitoneal 24 h, 7 días,	Indujo inflamación moderada y a seguir formó granulomas	[99]
GO	Espesor de 3,9 y 4,05 nm, tamaño de 350 nm y 2 µm	Ratones macho C57BL/6	Concentraciones en serie, subcutáneas inyección 21 días	GO micrométrico indujo respuestas de inflamación mucho más fuertes que GO de tamaño nanométrico	[34]
GO	Tamaño de 1110 a 16 200 nm	Ratones C57BL/6J	2 o 20 mg/kg, inyección subcutánea e intraperitoneal	Tanto GO como una reducción de GO resultaron en infiltración, captación y eliminación en células inmunitarias	[84]
Nanopartículas de óxido de hierro RGO (rGO-IONP)	Espesor de 10 nm Tamaño de 15,0 ± 2,0 nm	Ratones hembra Balb/c	400 µg, inyección subcutánea,	RGO-IONP puede inactivar eficazmente bacterias resistentes a múltiples fármacos en abscesos subcutáneos	[236]

Tabla 1 Toxicidad de GFNs en órganos (*continuación*)

GO GO-PEG	Espesor de 0,94, 1,22, 4,43 y 5,66 nm, tamaño de 450, 25, 50 y 27 nm	Ratones hembra balb/c	100 mg/kg, Administración oral; 50 mg/kg, inyección intraperitoneal, 1, 7 y 30 días	No hubo captación evidente en los tejidos a través de administración oral, lo que indica una adsorción intestinal de esos nanomateriales bastante limitada [237]
RGO	tamaños de rGO pequeño: 87,97 ± 30,83, tamaños de rGO grande: 472,08 ± 249,17 nm	Macho C57negro/6 ratones	60 mg/kg, sonda oral, 5 días	RGO afectó actividad locomotora general, equilibrio y coordinación neuromuscular, pero mostró pocos cambios en los comportamientos explorados, similares a la ansiedad o de aprendizaje y memoria. [31]

efectos nocivos en el desarrollo del tejido cerebral y se observó la ultraestructura atípica en el cerebro [101]. Las investigaciones recientes de GFNs en el sistema nervioso central están involucradas principalmente en la aplicación más que en la toxicidad. Los datos del estudio tóxico sobre los GFNs están en marcha.

Toxicidad en el sistema de reproducción y desarrollo

Grafeno prístino redujo la vascularización cardíaca y la densidad de los vasos ramificados después de inyección en huevos fertilizados de gallina, seguido de incubación durante 19 d [101]. GO y rGO dañan los embriones de pez cebra al influir en la tasa de eclosión del embrión y la longitud corporal de una manera dependiente a la concentración. Aunque no se observó ninguna malformación o mortalidad obvia en los embriones expuestos de pez cebra [102], GO se adhirió y se envolvió en el corion de los embriones de pez cebra, causando hipoxia notable y retraso en la eclosión. Los agregados de GO se retuvieron en muchos orgánulos, como los ojos, el corazón, el saco vitelino y la cola de los embriones, y se observó apoptosis y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en estas regiones [103].

Los GFNs ejercen diferentes efectos toxicológicos en el sistema reproductor masculino y femenino. Los datos mostraron que GO ejerció efectos tóxicos muy bajos o casi nulos sobre el sistema reproductor masculino incluso a una dosis alta mediante inyección intraabdominal [66]. Además, rGO no cambió los niveles séricos de estrógeno en los ratones hembra no embarazadas. La condición es diferente con las hembras de ratones: las hembras de ratones podrían dar a luz a una descendencia sana después de la inyección de rGO antes del apareamiento o durante gestación temprana, y solo unos pocos fetos anormales estaban presentes entre las camadas de hembras inyectadas con rGO. Sin embargo, las ratones preñadas abortaron a todas las dosis, y la mayoría de las ratones preñadas murieron cuando se inyectó la dosis alta de rGO durante gestación tardía [44]. Notablemente, el desarrollo de la descendencia en el grupo de dosis alta se retrasó durante el período de lactancia. La alta dosis de GO disminuyó el consumo de agua por los ratones maternos por exposición oral, lo que redujo la producción de leche y, por lo tanto, pospuso el crecimiento de la descendencia [53]. Aunque los hallazgos indican que GFNs son potencialmente perjudiciales para el desarrollo, los datos sobre toxicidad para la reproducción y el desarrollo siguen siendo deficientes. Todavía se necesitan estudios sobre la influencia de GFNs en la reproducción y el desarrollo masculino y femenino para dilucidar el mecanismo de toxicidad subyacente.

Influencia de hemocompatibilidad

La liberación de GO en la sangre es ineludible. Se descubrió que la hemocompatibilidad de GO es dependiente del revestimiento funcional y de las condiciones de exposición. GO con tamaño submicrónico resultó mayor actividad hemolítica, mientras que el grafeno agregado indujo reacción hemolítica más baja. Grafeno prístino y GO

demonstraron efecto hemolítico de hasta 75 µg/ml [104]. La polietilenglicol GO (GO-PEG) mostró una toxicidad notable al unirse a la HSA, incluso a 1,6 µg/ml [105]. El óxido de grafeno carboxilado (GO-COOH) mostró una citotoxicidad significativa hacia los linfocitos T a concentraciones superiores a 50 µg/ml y tuvo buena biocompatibilidad por debajo de 25 µg/ml, mientras que el GO-quitosano casi inhibió la actividad hemolítica [106]. Hasta ahora, el riesgo correspondiente de hemocompatibilidad ha sido en gran medida desconocido.

Concluyendo, la lesión pulmonar inducida por GFNs se ha estudiado en varias investigaciones, cuyos resultados han demostrado infiltración de células inflamatorias, edema pulmonar y formación de granuloma en los pulmones. Sin embargo, solo unos pocos estudios específicos han evaluado en otros órganos, como el hígado, el bazo y los riñones, y los síntomas de lesión, el índice de daño y el nivel de daño a estos órganos internos no se investigaron a fondo. Además, estudios sobre la neurotoxicidad de GFNs son bastante raros; no hay datos revelando qué nervios o áreas cerebrales experimentan daños, ni se han estudiado las manifestaciones conductuales relacionadas. La toxicidad de GFNs en el desarrollo puede inducir anomalías estructurales, retraso del crecimiento, anomalías conductuales y funcionales, e incluso muerte. Un estudio sobre la toxicidad de GFNs en la reproducción y en el desarrollo será extremadamente significativo y recibirá una amplia atención en el futuro. Casi todos los estudios de toxicidad de GFNs fueron experimentos de corto período, y ningún estudio ha investigado lesiones tóxicas crónicas a largo plazo. Sin embargo, según estudios de toxicidad de otros nanomateriales, la exposición a GFNs a largo plazo puede ser un factor importante que dañe la salud [107-109]. Por lo tanto, es necesario realizar estudios a largo plazo de GFNs.

Toxicidad de GFNs en modelos celulares

Se ha verificado la citotoxicidad de GFNs in vitro en varias células para cambiar la viabilidad y la morfología celular, destruir la integridad de membrana e inducir daños en el ADN [110-112]. GO o rGO disminuyen adhesión celular; inducen apoptosis celular; y entran en lisosomas, mitocondrias, núcleos celulares y endoplasma [113]. Los GQDs entraron en las células e indujeron daños en el ADN por el aumento de la expresión de las proteínas p53, Rad 51 y OGG1 en las células NIH-3 T3 [87]. Sin embargo, GQDs no plantearon una toxicidad significativa para las líneas celulares de cáncer de mama humano (a una dosis de 50 µg/ml) o para las células madre neurales humanas (a una dosis de 250 µg/ml) [114, 115]. Los derivados de GO disminuyeron drásticamente la expresión de genes diferenciales que son responsables por la estructura y función de membrana celular, como la regulación del citoesqueleto de actina, la adhesión focal y la endocitosis [89]. En las células del feocromocitoma de ratas (células PC12), el grafeno y el rGO causaron efectos citotóxicos y lesiones mitocondriales, como la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), un aumento en

la activación de la caspasa-3 y la generación de ROS [82, 116].

El grafeno puede aumentar la viabilidad celular [117] o causar la muerte celular [118] dependiendo de la línea celular, el tipo de material de grafeno y la dosis. Se observó citotoxicidad de GO en fibroblastos humanos y células epiteliales pulmonares a concentraciones superiores a 20 $\mu\text{g/ml}$ después de 24 h, pero se encontró toxicidad mínima en las células A549 a concentraciones superiores a 50 $\mu\text{g/ml}$ [119]. Las respuestas biológicas inducidas por GO como ROS, malondialdehído (MDA) y LDH aumentaron, mientras que la superóxido dismutasa (SOD) disminuyó dependiendo de la dosis en las células HeLa [120]. Sin embargo, baliza molecular GO (GO-MB) mostró una baja citotoxicidad incluso a 20 $\mu\text{g/ml}$ en las células HeLa [121]. GO disminuyó la viabilidad de las células A549, mientras que la misma concentración y tiempo de exposición aumentó la viabilidad celular de las células del carcinoma colorrectal de CaCo2 [122]. Otro estudio informó que GO mejoró drásticamente la diferenciación de SH-SY5Y, acompañada de un aumento de la longitud de neuritas y la expresión del marcador neuronal MAP2 a bajas concentraciones, pero que GO suprimió la viabilidad de las células SH-SY5Y a dosis altas ($\geq 80 \text{ mg/ml}$) [123]. Los recubrimientos funcionalizados en GO, como GO-PEG [124] y GO-quitosano [125], pueden atenuar profundamente la citotoxicidad de las partículas al inhibir las interacciones entre las células.

La toxicidad de los GFNs in vitro se resume en la tabla 2. Los datos sobre la citotoxicidad de los nanomateriales de grafeno son contrastantes, y diferentes características influyen en los resultados. Los mecanismos y los factores de influencia de la toxicidad deben dilucidarse en detalle.

Orígenes de la toxicidad de GFNs

Según se informa, las características del grafeno, incluida su concentración, dimensión lateral, estructura superficial, grupos funcionales, pureza y corona proteica, influyen fuertemente en su toxicidad en sistemas biológicos [2, 7, 104, 126-129].

Concentración

Numerosos resultados han demostrado que los materiales de grafeno causan toxicidad dependiente de la dosis en animales y en células, como lesiones hepáticas y renales, formación de granulomas pulmonares, disminución de la viabilidad celular y apoptosis celular [130-134]. En estudios in vivo, GO no mostró toxicidad evidente en ratones expuestos a una dosis baja (0,1 mg) y media (0,25 mg), pero indujo toxicidad crónica a una dosis alta (0,4 mg). El alto contenido de GO se depositó principalmente en los pulmones, hígado, bazo y riñones y fue difícil de ser excretado por los riñones después de una sola inyección en la vena trasera [135]. Curiosamente, el aumento de la dosis resultó en una disminución dramática de la captación hepática, pero un aumento en la captación pulmonar de s-GO por inyección intravenosa [31], porque la alta dosis de GO potencialmente superó la saturación de absorción o agotó la masa de opsoninas plasmáticas, lo que en consecuencia suprimió la absorción hepática.

Además, un estudio in vitro informó que 20 $\mu\text{g/ml}$ de nanohojas GO no mostraban citotoxicidad en A549 dentro de 2 h de incubación, pero a una concentración más alta (85 $\mu\text{g/ml}$) disminuyó la viabilidad celular al 50 % dentro de 24 h [136, 137]. Lü et al. también demostraron que GO no tenía citotoxicidad obvia a bajas concentraciones durante 96 h en una línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano, pero la viabilidad de las células disminuyó bruscamente al 20 % después del tratamiento con 100 mg/ml de GO durante 96 h de incubación [123]. Los resultados en células HeLa, células NIH-3 T3 y células de cáncer de mama (SKBR3, MCF7) tratadas con nanocintas de grafeno también mostraron una disminución de la viabilidad celular dependiente de la dosis (10-400 mg/ml) y del tiempo (12-48 h) [138]. Aumentando las concentraciones GO entró en los lisosomas, las mitocondrias, el endoplasma y el núcleo celular [119]. Varios datos indicaron que rGO causaba muerte celular mediada por apoptosis a una dosis más baja y en un momento temprano, pero que necrosis fue prevalente con el aumento del tiempo/dosis [110, 135].

Dimensión lateral

Nanopartículas con tamaños $< 100 \text{ nm}$ pueden entrar en la célula, $< 40 \text{ nm}$ pueden entrar en el núcleo y menos de $< 35 \text{ nm}$ pueden cruzar la barrera hematoencefálica [85]. Un estudio mostró que GO (588, 556, 148 nm) no entró en las células A549 y no tenía citotoxicidad obvia [112]. Cuando el diámetro del grafeno está entre 100 ~ 500 nm, el de tamaño más pequeño puede causar la toxicidad más grave, y cuando el diámetro es inferior a 40 nm, los tamaños más pequeños pueden ser los más seguros. Por ejemplo, rGO con un diámetro de $11 \pm 4 \text{ nm}$ podría entrar en el núcleo de los hMSC y causar aberraciones cromosómicas y fragmentación del ADN a concentraciones muy bajas de 0,1 y 1,0 mg/ml en 1 h. Sin embargo, las láminas rGO con diámetros de $3,8 \pm 0,4 \text{ nm}$ no mostraron una genotoxicidad notable en los hMSC incluso a una dosis alta de 100 mg/ml después de 24 h [118].

En un estudio in vivo, s-GO (100-500 nm) se acumuló preferentemente en el hígado, mientras que l-GO (1-5 μm) se localizó principalmente en los pulmones porque l-GO formó complejos más grandes de proteínas-GO que fueron filtrados por los vasos capilares pulmonares después de la inyección intravenosa [31]. Dados las dimensiones laterales relativas (205,8 nm, 146,8 nm y 33,78 nm) de las tres nanohojas GO a la misma concentración, el GO más pequeño experimenta mayor absorción que el GO más grande en las células Hela [139]. La alta absorción de s-GO cambió el microambiente de las células y, en consecuencia, indujo mayor pérdida de viabilidad y estrés oxidativo más grave entre los tres tamaños de las muestras de GO [119]. Como resultado, un estudio delineó que GO dependiente del tamaño indujo polarización M1 en macrófagos y respuestas proinflamatorias in vitro e in vivo. GO más grande mostró una adsorción más fuerte en la membrana plasmática con menos fagocitosis, provocando interacciones robustas con las TLR y activando las vías NF- κB , en comparación con las hojas de GO más pequeñas, que eran

Tabla 2 Toxicidad de GFNs en modelos celulares

Familia del grafeno nanomateriales	Propiedades fisicoquímicas y Funcionalización	Células	Dosis y tiempo de incubación	Efectos	Reference
Grafeno prístino	Espesor de 2-3 nm, tamaño de 500-1000 nm	Macrófagos murino RAW 264.7	5, 10, 20, 40, 80 y 100 mg/ml, 48 horas	Agotamiento del potencial de membrana mitocondrial, aumento de ROS, apoptosis desencadenada	[83]
Grafeno prístino	Espesor de 3-5 nm, tamaño de 100-110 nm	Células de feocromocitoma de rata Células PC12	10–100 µg/mL 1–48 h	Aumento de liberación de LDH, niveles de ROS y activación de caspasa3, apoptosis inducida	[82]
Óxido de grafeno (GO)	Cuatro diámetros diferentes (342–765 nm)	Eritrocitos humanos Fibroblastos de piel humana CRL-2522	3,125-200 µg/mL 24 h	Actividad hemolítica, generación de ROS, liberación de LDH, disminución de la viabilidad celular	[106]
GO	Espesor de 0,9 nm tamaño lateral: s-GO, 160 ± 90 nm; m-GO, 430 ± 300 nm; l-GO, 780 ± 410 nm	Células A549 epiteliales de pulmón humano	10, 25, 50, 100 y 200 µg/mL 24 h	Estrés oxidativo dependiente de la dosis, disminución de viabilidad celular a altas concentraciones	[119]
GO	Espesor de 1 nm, dimensión lateral de 200-500 nm	Fibroblastos de pulmón humano células HLF	10–500 µg/mL 2–24 h	Estrés oxidativo inducido, citotoxicidad y genotoxicidad dependientes de concentración	[148]
GO	Distribución por tamaños: 592 ± 10,9 nm en PBS, 1272 ± 56,2 nm en FBS	Células HeLa	0–80 µg/mL 24 h	Liberación de LDH, aumento de MDA y generación de ROS, disminución de SOD, reducción de la viabilidad celular,	[120]
GO	GO de tamaño más pequeño: 50–350 nm GO de tamaño intermedio: 350–750 nm GO de tamaño más grande: 750–1300 nm	Célula de macrófago J774A.1 Células THP-1 Células HEK293 Células MEL Células HUT102	20 µg/mL 1-24 h	Inducción de macrófagos M1 dependiente del tamaño, respuestas proinflamatorias	[94]
GO	espesor: < 2 nm, tamaño lateral: 450 nm	Célula de carcinoma de colon CT26 de ratón	50–100 µg/mL 18 h	Desencadena autofagia, aumenta muerte celular	[206]
Óxido de grafeno reducido (rGO)	Espesor de 11 ± 4 nm tamaño lateral de 3,8 ± 0,4 µm	Células madre mesenquimales humanas (hMSC)	0,01–100 µg/mL 1–24 h	Fragmentaciones de ADN inducidas y aberraciones cromosómicas	[118]
RGO	Espesor de 7 nm tamaño lateral de 40 nm	células de carcinoma de hígado humano (células HepG2)	1–200 mg/L 4–72 horas	Daño al ADN dependiente de la dosis, estrés oxidativo, citotoxicidad	[31]
RGO	Tamaño lateral de 100–1500 nm	Líneas celulares de glioma U87 y U118	0–100 µg/mL 24 h	Reducción de la proliferación celular y viabilidad celular, induce apoptosis	[238]
Óxido de grafeno reducido bacterianamente (B-rGO)	Espesor de 4,23 nm tamaño medio de 3833 nm	Células MCF-7	20–100 µg/mL 24–72 h	Mayor generación de ROS, liberación de LDH, toxicidad dependiente de la dosis	[181]
Nanocintas de óxido de grafeno reducido (rGONR)	Espesor de 1 nm, longitud de 10 µm, ancho de 50–200 nm,	hMSCs	0,01, 0,1, 1,0, 10, 100 µg/mL 96 h	Provocó fragmentaciones de ADN y aberraciones cromosómicas.	[239]
Hojas de óxido de grafeno reducido (rGOss)	Espesores de ~1,2 nm, tamaños laterales de ~2 µm	hMSCs	0,01, 0,1, 1,0, 10, 100 µg/mL 96 h	Causó daño leve a la membrana celular y citotoxicidad.	[239]
Grafeno-dextrano (GO-DEX)	Espesor de 2,8 nm tamaño de 50–100 nm	Células HeLa	10, 50, 200 mg/L 24, 48, 72 h	GO-DEX redujo notablemente la toxicidad celular	[91]
GNP-COOH GNP-NH2	Espesor de GNP-COOH: 735,9 nm espesor de GNP-NH2: 945,5 nm	Células epiteliales bronquiales humanas (células BEAS-2B)	10, 50 mg/L 24 h	Causó daños al ADN monocatenario, genotoxicidad e hipometilación	[240]

Tabla 2 Toxicidad de GFNs en modelos celulares (*continuación*)

PEG-DSPE (O-GNR-PEG-DSPE))	Ancho de 125 a 220 nm, longitudes entre 500 y 2500 nm	células HeLa Células NIH-3 T3 Células SKBR3 Células MCF7	10–400 µg/mL 24–48 h	Disminución de la viabilidad celular dependiente de la dosis y del tiempo	[138]
PEI-GO, PEG-GO, LA-PEG-GO	Espesor de 1–2 nm, ancho lateral de 100–500 nm	Células de fibroblastos de pulmón humano	1, 10, 50, 100 µg/ml 24 h	Causó citotoxicidad y genotoxicidad dependientes de la concentración	[15]
PEG-GQD	Tamaños de 3 a 5 nm	Células HeLa y células A549	10–160 µg/mL 24 h	Sin citotoxicidad apreciable	[176]
FBS-GO	Espesor de 4,0 a 18,0 nm	Células A549	0–200 µg/mL 24 h	La citotoxicidad de GO se mitigó en gran medida al 10 % de FBS	[166]

más bien absorbidas por las células [94]. Para descubrir aún más el mecanismo detallado que subyace a estos efectos, se necesitan más estudios para ilustrar el mecanismo vital de la dimensión lateral de los materiales de grafeno.

Estructura de superficie

GFNs poseen una química superficial muy variada. Por ejemplo, la superficie de grafeno prístino es hidrofóbica, la superficie de GO es parcialmente hidrofóbica con grupos carboxilos [140-142], y rGO tiene hidrofiliidad intermedia [143]. Se observó que GFNs alteraban la función y la estructura de las membranas celulares y proteínas, probablemente por interacciones moleculares excepcionalmente fuertes con las células [2, 91]. Por ejemplo, rGO se unió a las membranas celulares, estimuló receptores y activó vías en la mitocondria, induciendo apoptosis [110, 111, 144]. Evidencia limitada mostró que GO es más pequeño y menos tóxico que rGO debido a su alto contenido de oxígeno, bordes más suaves y propiedades hidrófilas [104, 145, 146]. Debido a los diferentes estados de oxidación superficial del GO y rGO, GO que posee una hidrofiliidad distinta podría ser internalizado y absorbido por las células HepG2 más fácilmente. Por el contrario, rGO, con hidrofobicidad evidente, podría adsorberse y agregarse en superficies celulares sin (o con menor) absorción [110]. Debido a las fuertes interacciones de apilamiento π - π , el grafeno tiene alta capacidad de romper muchos residuos de proteína, en particular los aromáticos, como la villin headpiece

(HP), F10, W23 y F35. Las estructuras secundarias y terciarias de la proteína se encuentran en gran medida en la superficie del grafeno, lo que interrumpe su estructura y función [41] (Fig. 2). Además, GO puede insertar entre los pares de bases de ADN de doble cadena y perturbar el flujo de información genética a nivel molecular, lo que podría ser una de las principales causas del efecto mutagénico de GO [7, 112, 146, 147].

Carga

Varios estudios han destacado la importancia de la carga superficial en GO debido a su capacidad para afectar al mecanismo de internalización y absorción por las células [148-150]. La internalización del GO fue insignificante en los no-fagocitos, lo que probablemente se debió a la fuerte repulsión electrostática entre el GO cargado negativamente y la superficie celular [34]. Sin embargo, otros han sugerido que las nanopartículas con carga negativa pueden internalizarse en células no fagocíticas uniéndose a los sitios catiónicos disponibles en la superficie celular y ser absorbidas por receptores carroñeros [110, 146, 150]. Según se informa, las partículas de GO/GS causan cambios morfológicos y significativa lisis, lo que conduce a alta hemólisis en los glóbulos rojos (RBC). La perturbación de la membrana de los glóbulos rojos probablemente se atribuye a las fuertes interacciones electrostáticas entre los grupos de oxígeno cargados negativos en la superficie de GO/GS y los lípidos de fosfatidilcolina cargados positivamente en la membrana externa de los glóbulos rojos [106].

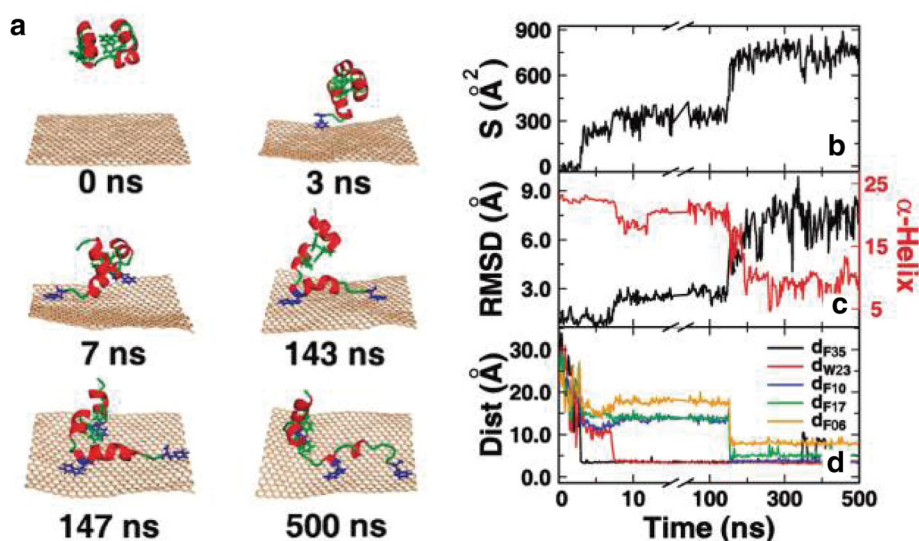


Fig. 2 Una representación de la trayectoria de HP35 adsorbiendo el grafeno. (a) Snapshots representativos de varios momentos. Las proteínas se muestran en dibujos con hélices en rojo y bucles en verde, y el grafeno se muestra en hojas. Los residuos aromáticos que forman las interacciones de apilamiento π - π se muestran en azul, otros en verde. (b) Superficie de contacto de HP35 con el grafeno. (c) RMSD de HP35, de su estructura nativa y el número de residuos en la hélice α . Aquí, las estructuras secundarias están determinadas por el programa DSSP. (d) Distancia entre el grafeno y los residuos aromáticos, incluidos F35, W23, F10, F17 y F06. Para mostrar el proceso de adsorción más claramente, se truncó y se reescaló el eje-x. [41] Derechos de autor (2011), con permiso de Journal of Physical Chemistry

Funcionalización

Estudios confirmaron que la funcionalización con los grupos PEG [52], poli-L-lisina PEGilada (PLL) [151], poli(ϵ -caprolactona) [152], alcohol polivinílico [3], Plurónico [153], amina [98], carboxilo y dextrano [79] disminuye en gran medida la toxicidad y mejora la biocompatibilidad del grafeno. Los resultados in vivo revelaron que solo surgió una inflamación crónica leve después de la inyección subcutánea de hidrogel GO-Plurónico y no se probó ninguna toxicidad notable a corto plazo después de la inyección intravenosa de GO-DEX [79, 154]. GS PEGilado no indujo toxicidad apreciable en ratones expuestos a 20 mg/kg durante 3 meses, según lo evaluado por bioquímica de la sangre y exámenes histológicos, y mostró una retención relativamente baja en el RES [52, 155]. El recubrimiento GO con quitosano casi eliminó la actividad hemolítica en la sangre [39]. Además, el revestimiento con PEG alivió eficazmente las lesiones agudas del tejido inducidas por GO; disminuyó la agregación y retención de GO en el hígado, pulmones y bazo; y promovió la eliminación de GO [81], GO-DEX [79] y el óxido de grafeno fluorado (FGO) [156].

In vitro, varios ensayos de función celular mostraron pruebas claras de que la funcionalización superficial del grafeno prístino o GO era crítica para reducir los fuertes efectos de toxicidad [91]. PEG-GO, PEI-GO y LA-PEG-GO dañaron las células fibroblásticas pulmonares humanas menos que GO [148]. PEG-GO no mostró citotoxicidad hacia varios cultivos celulares, como células de glioblastoma (U87MG), células de cáncer de mama (MCF-7), células de carcinoma de ovario humano (OVCAR-3), células de cáncer de colon (HCT-116) y células linfoblastoides (RAJI), a concentraciones de hasta 100 $\mu\text{g/ml}$ [119, 157, 158]. GQD-PEG mostraron toxicidad muy baja o nula contra células cancerosas de pulmón y cuello uterino, incluso a concentraciones muy altas (200 $\mu\text{g/ml}$) [159]. Sin embargo, como un material no biodegradable con un gran potencial de internalización celular, se necesitan más investigaciones para evaluar los posibles efectos adversos a largo plazo del grafeno funcionalizado.

Agregaciones y sedimentación

Según se informa, los nanomateriales tienen una propensión a formar agregados en lugar de unidades individuales, particularmente en condiciones fisiológicas. Las superficies GS permitieron menos agregados de glóbulos rojos en comparación con GO, y GS tuvo menor actividad hemolítica para la formación de agregaciones más acuosas. Por el contrario, la rápida sedimentación y formación de agregados de GS inhibieron en gran medida la disponibilidad de nutrientes para las células fibroblásticas de piel humana que se cultivaban en el fondo de los pozos [106]. Por lo tanto, las agregaciones y la sedimentación de las partículas de grafeno ejercen efectos variables en diferentes células.

Impurezas

La pureza de nanomateriales es una consideración importante porque metales residuales contaminantes pueden ser responsables

or la toxicidad observada, en lugar del nanomaterial en sí, lo que ha dado lugar a datos contradictorios sobre la citotoxicidad de los GFNs [35, 160]. GO preparado tradicionalmente a menudo contiene altos niveles de Mn^{2+} y Fe^{2+} , que son altamente mutagénicos para las células. La liberación inespecífica de estos iones en el preparado tradicional de GO podría conducir a niveles inusualmente altos de citotoxicidad y fracturación del ADN [39]. En particular, Peng et al. [161] produjeron GO de alta pureza que contenía solo 0,025 ppm Mn^{2+} y 0,13 ppm Fe^{2+} , y Hanene et al. [162] inventaron un nuevo método para preparar hojas de GO de una sola capa de alta pureza, buena dispersión acuosa y estabilidad coloidal. GO producido por estos nuevos métodos no indujo respuestas citotóxicas significativas (a dosis de exposición de hasta 100 $\mu\text{g/ml}$) in vitro, y no se observó in vivo respuesta inflamatoria obvia ni formación de granuloma (dosis de exposición de hasta 50 $\mu\text{g/animal}$). Por lo tanto, la pureza de GFNs merece atención y es un paso vital hacia la determinación de GFNs involucrados en bioaplicaciones.

Efecto corona de proteínas

Debido a la alta carga superficial libre, los nanomateriales pueden formar fácilmente "coronas" con proteínas en los sistemas biológicos [163, 164]. Se sugiere que la proteína corona afecta la circulación, distribución, eliminación y toxicidad de las nanopartículas. Varios artículos informaron que GO forma coronas de proteína-GO con proteínas plasmáticas adsorbidas en el suero y estas coronas de proteína-GO desempeñan un papel importante en la decisión del destino y comportamiento biocinético del GO in vivo. Estas coronas de proteína-GO pueden regular la adhesión del GO a las células endoteliales e inmunitarias a través de interacciones específicas e inespecíficas [165]. Básicamente, la inmunoglobulina G y las proteínas del complemento en la proteína corona ayudan a reorganizar las nanopartículas en las células inmunitarias, haciendo que las partículas sean absorbidas por el RES, y el GO recubierto de IgG fue absorbido por interacciones específicas o inespecíficas con los receptores de la membrana celular [31, 165]. Sin embargo, otro estudio encontró que GO no podía adherirse directamente a las células epiteliales de la mucosa en el tracto intestinal después de que los ratones filiales bebieran una solución GO acuosa porque abundantes proteínas en la leche se habían adsorbido en la superficie del GO y, por lo tanto, habían inhibido su interacción directa con las células epiteliales de la mucosa [53]. Proteína corona mitigó la citotoxicidad de GO limitando su interacción física con la membrana celular y reduciendo el daño morfológico celular en las células HeLa, THP-1 y A549 [166-168]. El efecto citotóxico se redujo en gran medida cuando GO fue previamente recubierto con FBS y se incubó con células; se observó casi 90 % de supervivencia con GO recubierto por 100 $\mu\text{g/ml}$ de FBS y 100 % de supervivencia con GO recubierto por FBS de 20 $\mu\text{g/ml}$. Se observaron tendencias similares para GO cubierto por BSA [166, 169]. Coherentemente, suero adicional podría neutralizar la toxicidad del GO prístino en células J774.A1 a una dosis de 4 $\mu\text{g/ml}$, lo que

conduce a una disminución en el número de células del 52,5 % en comparación con las células no tratadas [89].

Después de revisar muchos estudios, se puede concluir que la toxicidad del grafeno está influenciada por múltiples factores. Esos factores se combinaron para cambiar en gran medida la toxicidad de GFNs en muchos casos. Estudios científicos a menudo necesitan una identificación clara de causa y el efecto, y se debe mantener solo un factor a la vez, para que se pueda determinar el efecto de ese único factor. Pero en algunos artículos, se estudiaron al mismo tiempo varios factores que influyen en la toxicidad de GFNs, lo que llevó a resultados confusos.

Posibles mecanismos de GFNs toxicidad

Aunque algunas propiedades fisicoquímicas y la toxicidad de GFNs han sido bien estudiados por muchos investigadores, los mecanismos exactos que subyacen a la toxicidad de GFNs siguen siendo oscuros. En Fig. 3 se ilustra esquemáticamente los principales mecanismos de citotoxicidad de GFNs.

Destrucción física

El grafeno es un nanomaterial único en comparación con otras nanopartículas esféricas o unidimensionales debido a su estructura bidimensional con carbonos sp^2 . La interacción física de las nanopartículas de grafeno con las membranas celulares es una de las principales causas de su citotoxicidad [7, 170, 171]. El grafeno tiene una alta capacidad para unirse a las estructuras α -helicales de los péptidos debido a su favorable curvatura superficial [172]. A una concentración superior a 75 $\mu\text{g/ml}$, el grafeno pristino se adhirió en gran medida a las superficies de las células RAW 264,7 y dio lugar a un estiramiento anómalo de la membrana celular [104]. Las fuertes interacciones hidrofóbicas de GFNs con la membrana celular condujeron a la extensión morfológica de filopodios F-actina y disfunción citoesquelética. Además, los bordes afilados de GNS pueden actuar como "cuchillas", insertando y cortando las membranas celulares bacterianas [173]. Además, GO también dañó directamente la membrana externa de

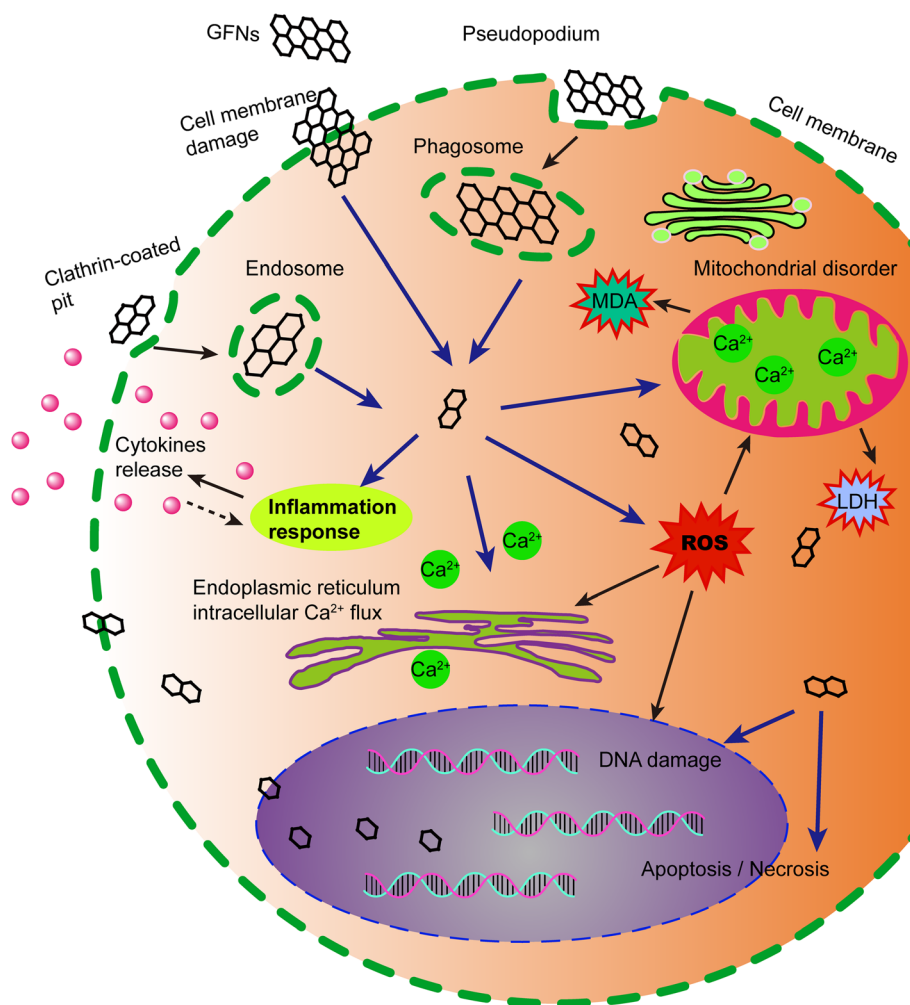


Fig. 3 Diagrama esquemático mostrando los posibles mecanismos de citotoxicidad de GFNs. Los GFNs entran en las células de diferentes maneras, lo que induce generación de ROS, aumento de LDH y MDA y la liberación de Ca^{2+} . Posteriormente, GFNs causan lesiones celulares, por ejemplo, daño a la membrana celular, inflamación, daño al ADN, trastornos mitocondriales, apoptosis o necrosis

bacteria *E. coli*, lo que resultó en la liberación de componentes intracelulares [173]. Sin embargo, imágenes TEM revelaron que el GO prereducido con FBS eliminó la destrucción de las membranas celulares [166].

Producción de ROS que conduce al estrés oxidativo

El estrés oxidativo surge cuando un aumento de los niveles de ROS abruma la actividad de las enzimas antioxidantes, incluidas catalasa, SOD, o glutatión peroxidasa (GSH-PX) [174]. ROS actúan como segundos mensajeros en muchas cascadas de señalización intracelular y provocan daños macromoleculares en las células, como descomposición de los lípidos de membrana, fragmentación del ADN, desnaturalización de proteínas y disfunción mitocondrial, que influyen en gran medida en el metabolismo y en la señalización celular [175-177]. Las interacciones de GO con las células pueden conducir a una generación excesiva de ROS, que es el primer paso en los mecanismos de carcinogénesis, envejecimiento y mutagénesis [83, 122]. El estrés oxidativo tuvo un papel significativo en la lesión pulmonar aguda inducida por GO [30], y las respuestas inflamatorias causadas por el estrés oxidativo a menudo surgieron tras la exposición a los GFN [133, 177, 178]. La actividad de SOD y GSH-PX disminuyó después de exponerse a GO de manera dependiente del tiempo y dosis [82, 106, 119]. Del mismo modo, el estrés oxidativo fue la causa clave de apoptosis y daño al ADN después que células del HLF fueron expuestas a GO [148]. Tanto la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (JNK, ERK y p38) como las vías de señalización relacionadas con el TGF beta se desencadenaron por la generación ROS en las células tratadas con grafeno prístino, acompañada de la activación de Bim y Bax, que son dos miembros pro-apoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2. Como resultado, se activaron la caspasa-3 y sus proteínas efectoras, como PARP, y se inició la apoptosis [83, 179]. Información detallada sobre las vías de señalización relacionadas con MAPK, TGF- β y TNF- α , que inducen inflamación, apoptosis y necrosis, se resume en la Fig. 4.

Daño mitocondrial

Las mitocondrias son centros de producción de energía involucrados en diversas vías de señalización en las células y también son un punto clave en la regulación apoptótica [83]. Después de la exposición al GO y al carboxil grafeno (GXYG), la membrana mitocondrial se despolarizó y la cantidad de mitocondrias disminuyó en células HepG2 [180]. La exposición a GFNs dio lugar a un aumento significativo del consumo de oxígeno mitocondrial acoplado y no acoplado, a disipación del potencial de membrana mitocondrial y a eventual desencadenamiento de apoptosis mediante la activación de la vía mitocondrial [181]. Por ejemplo, GO aumentó la actividad de los complejos de transporte de electrones mitocondriales I/ III y el suministro de electrones a los sitios I/II de la cadena de transporte de electrones, acelerando la generación de ROS durante respiración mitocondrial en las células MHS [99]. La

formación de $\bullet\text{OH}$ mediada por GO y el sistema de transferencia de electrones del citocromo-c/H₂O₂ podrían aumentar el estrés oxidativo y térmico perjudicando el sistema respiratorio mitocondrial y, finalmente, dando lugar a una toxicidad dramática [151]. Además, las partes de oxígeno en GO podrían aceptar electrones de las proteínas redox celulares, apoyando el ciclo redox del citocromo-c y las proteínas de transporte de electrones, y los citocromos MtrA, MtrB y MtrC/ OmcA podrían estar involucrados en la transferencia de electrones a GO [182]. Por lo tanto, a excepción del daño a la membrana plasmática y la inducción del estrés oxidativo, GFNs pueden causar apoptosis y/o necrosis celular al influir directamente en la actividad mitocondrial celular [183, 184].

Daño en el ADN

Debido a su pequeño tamaño, alta superficie y carga superficial, GO puede poseer propiedades genotóxicas significativas y causar graves daños en el ADN, por ejemplo, fragmentación cromosómica, roturas de hebras de ADN, mutaciones puntuales, aductos oxidativos de ADN y alteraciones [87, 122, 185, 186]. Se observó mutagénesis en ratones después de inyección intravenosa de GO a una dosis de 20 mg/kg en comparación con ciclofosfamida (50 mg/kg), un mutágeno clásico [112]. Incluso si GO no puede entrar en el núcleo de una célula, todavía puede interactuar con el ADN durante la mitosis cuando la membrana nuclear se descompone, lo que aumenta la oportunidad de aberraciones en el ADN [87, 147, 187, 188]. La interacción de apilamiento π entre los anillos de carbono de grafeno y los pares de bases de ADN hidrófobo puede hacer que un segmento de ADN "se levante" o "se ponga" en la superficie del grafeno con su eje helicoidal perpendicular o paralelo, respectivamente. Las fuerzas intermoleculares deforman gravemente los pares de bases finales del ADN, lo que potencialmente aumenta la genotoxicidad [189]. GO también puede inducir fragmentación cromosómica, aductos de ADN y mutaciones puntuales promoviendo estrés oxidativo o desencadenando inflamación a través de la activación de vías de señalización intracelular como MAPK, TGF- β y NF- κ B [110, 112, 146]. El grafeno y el rGO también pueden elevar la expresión de p53, Rad51 y MOGG1-1, que reflejan el daño cromosómico, y disminuir la expresión de CDK2 y CDK4 llevando el ciclo celular de la fase G1 a la fase S en varias líneas celulares [112]. Daño al ADN no solo puede iniciar el desarrollo del cáncer, sino que también posiblemente amenaza la salud de la próxima generación si el potencial mutagénico de la GO surge en células reproductivas, lo que afecta fertilidad y la salud de la descendencia [112, 190].

Respuesta inflamatoria

GFNs pueden causar una respuesta inflamatoria significativa que incluye infiltración de células inflamatorias, edema pulmonar y formación de granuloma a dosis altas a través de instilación intratraqueal o administración intravenosa [30, 49]. Las plaquetas son componentes importantes en la formación de coágulos para

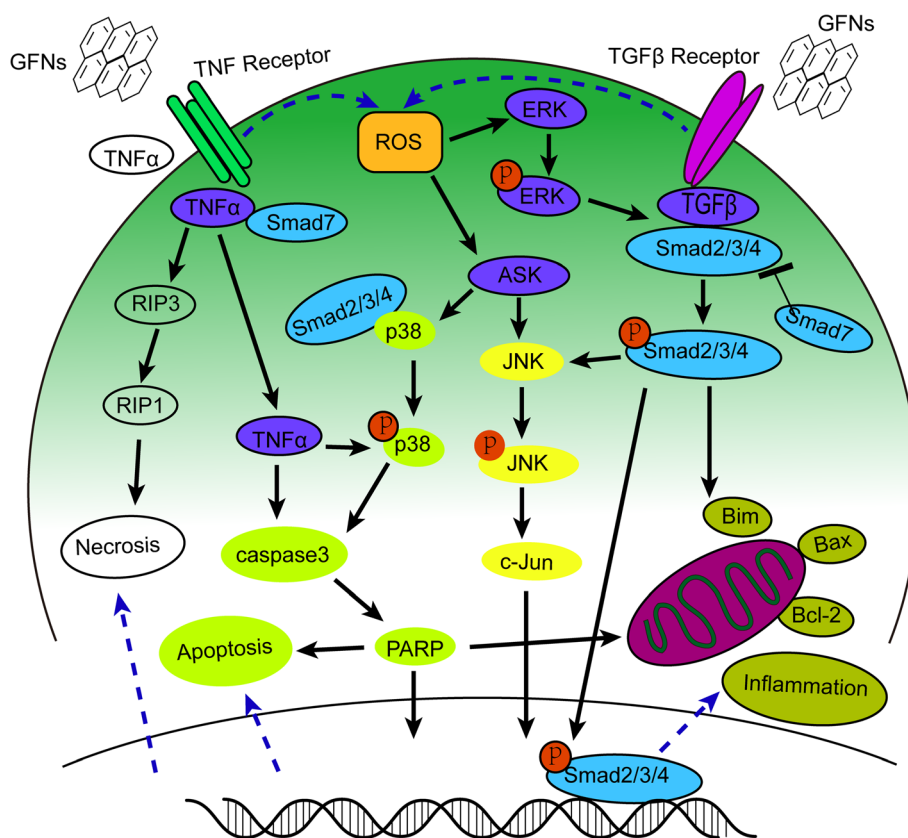


Fig. 4 Diagrama esquemático de las vías dependientes de MAPK, TGF-beta y TNF- α implicadas en la toxicidad de GFNs. ROS fueron los principales factores que activaron las vías de señalización MAPK y TGF-beta para conducir a la activación de Bim y Bax, desencadenando la cascada de las caspasas y la vía JNK. La activación de la caspasa 3 y RIP1 dio lugar a apoptosis y necrosis finalmente

atacar patógenos y partículas durante una respuesta inflamatoria, y GO podría activar directamente a la formación de trombos ricos en plaquetas y ocluir vasos pulmonares después de inyección intravenosa [98, 191]. Una fuerte respuesta inflamatoria fue inducida por inyección subcutánea con GO durante 21 días, junto con la secreción de citocinas clave, incluidas IL-6, IL-12, TNF- α , MCP-1 e IFN-g [34, 192]. GFNs pueden desencadenar respuesta inflamatoria y lesión tisular al liberar citocinas y quimiocinas que conducen al reclutamiento de monocitos circulantes y estimulan la secreción de citocinas Th1/Th2 y quimiocinas [124, 193]. Además, grafeno prístino [193] y rGO [110] evocan una respuesta inflamatoria al unirse a receptores de peaje (TLR) y activar la vía de señalización NF- κ B en las células. La cascada de señalización NF- κ B es desencadenada por TLR y citocinas proinflamatorias como IL-1 y TNF- α . Tras la activación, el NF- κ B pasa del citoplasma al núcleo, facilitando la unión del I κ B degradante y actuando como factor de transcripción para sintetizar a muchas citocinas proinflamatorias [194]. En la Fig. 5 se muestra un esquema de la ruta de señalización de TLR4 y TLR9 activada por GFNs.

Apoptosis

Apoptosis se define como la autodestrucción de una célula regulada por genes a través de programas complicados [83, 195]. GO y rGO causaron apoptosis e inflamación en los pulmones de ratones después de inhalación [99], y GFNs también tuvieron efectos proapoptóticos en células [111, 113, 124, 196]. Además, el grafeno y el GO dañaron físicamente las membranas celulares [166], aumentaron la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y cambiaron el potencial de membrana mitocondrial; el aumento del ROS desencadenó las vías de señalización MAPK y TGF- β y activó la caspasa-3 a través de cascadas apoptóticas dependientes de mitocondrias, provocando la ejecución de apoptosis [83, 99]. Del mismo modo, rGO causó apoptosis a una dosis baja y en un momento temprano, desencadenada por el receptor-de-muerte y la vía mitocondrial canónica [110]. Otro estudio mostró tres vías diferentes de apoptosis por GFNs: GO condujo apoptosis dependiente de ROS a través de interacción directa con los receptores de proteínas y la posterior activación de la vía de linfoma en células B-2 (Bcl-2); GO-COOH transmitió una señal pasiva de apoptosis al ADN nuclear al unirse a receptores de proteínas y activar una vía independiente de ROS; Sin embargo,

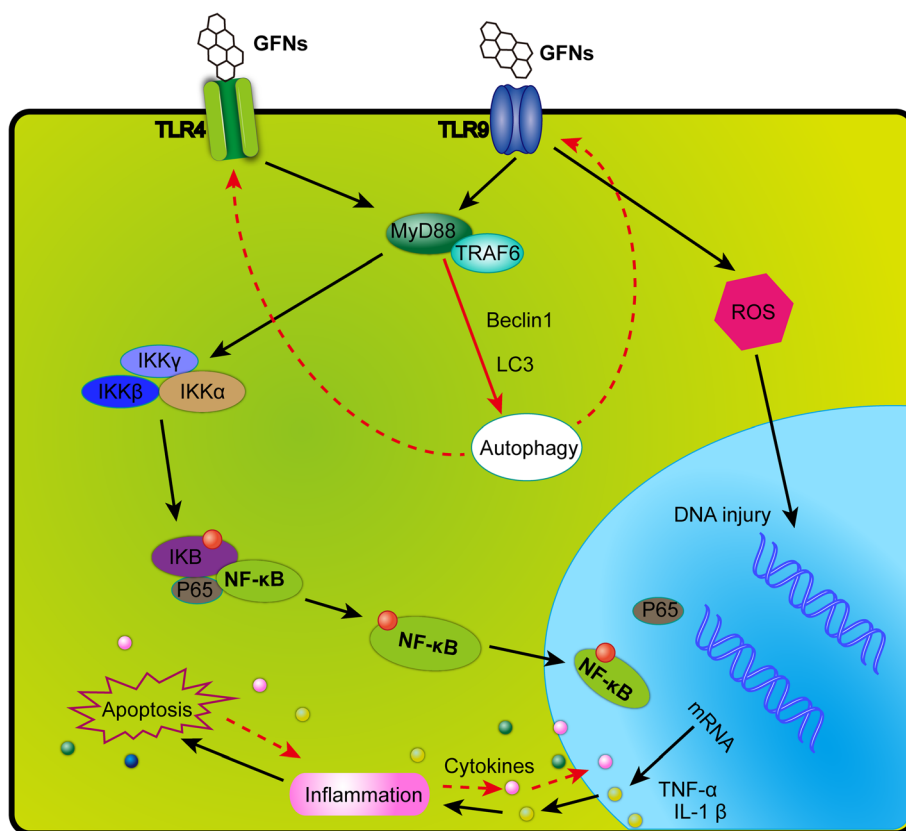


Fig. 5 Un diagrama esquemático explicando las vías de señalización de TLR4 y TLR9 responsables por la citotoxicidad inducida por los GFNs. Los GFNs pueden ser reconocidos por los TLR, activando así IKK e IκB mediante un mecanismo dependiente de MyD88, lo que resulta en la liberación de subunidades NF-κB e inicia translocación en el núcleo. Por lo tanto, factores proinflamatorios se transcribieron y segregaron fuera del núcleo, modulando respuestas inmunitarias iniciando autofagia programada, apoptosis y necrosis

GO-PEI dañó gravemente las membranas de linfocitos T para desencadenar la apoptosis [105, 197].

Autofagia

Autofagia es el proceso de autodegradación de componentes celulares y recientemente reconocido como muerte celular no apoptótica [198-200]. La activación de autofagia requiere la formación de autofagosomas que contengan Beclin 1, múltiples proteínas relacionadas con la autofagia (ATG), y cadena ligera de proteínas asociadas a microtúbulos 3 (LC3) y p62 [201]. Autofagia-cierta acumulación está asociada con la exposición a varias nanopartículas [202-205], y la autofagia puede eliminar organismos extracelulares y destruir los organismos en el citosol [206]. Se ha demostrado que GO y GQD inducen la acumulación de autofagosomas y la conversión de LC3-I a LC3-II; y inhiben la degradación de la proteína p62 del sustrato autofágico [207, 208]. Además, GO puede simultáneamente desencadenar respuestas TLR4 y TLR9 en macrófagos [34, 192] y en células de cáncer de colon CT26 [206]. La vía de autofagia está vinculada a la fagocitosis mediante la señalización TLR en macrófagos [206, 209].

Necrosis

Necrosis es una forma alternativa de muerte celular inducida por respuestas inflamatorias o lesiones celulares. La exposición de células a grafeno prístino causa apoptosis y necrosis a dosis altas (50 mg/ml) [83]. Según se informa, escape de LDH y la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, inducida por un nivel elevado de Ca^{2+} citoplasmático, llevaron a apoptosis/necrosis [210]. Se reveló que tratamiento con GO inducía necrosis macrofágica al activar la señalización TLR4 y, posteriormente, desencadenar parcialmente la producción de $\text{TNF-}\alpha$ autocrino [93]. GO combinado con CDDP (GO/CDDP) desencadenó necrosis al disminuir RIP1 y aumentar las proteínas RIP3, acompañadas con la liberación del grupo B1 de alta movilidad (HMGB1) en el citosol desde el núcleo y fuera de las células CT26 [205, 211, 212].

Cambios epigenéticos

Epigenética implica la metilación del ADN, la Impresión genómica, los efectos maternos, el silenciamiento de genes y la edición de ARN [213-215]. La metilación del ADN, que es una de las modificaciones epigenéticas mejor estudiadas, incluye fosforilación,

ubiquitinación y ribosilación de ATP y puede conducir al remodelado de la cromatina [197, 216, 217]. Un artículo reciente informó que la exposición a SL-GO/FL-GO resultó en hipermetilación global del ADN a través de regulación ascendente de los genes DNMT3B y MBD1; tratamiento con el GNP causó hipometilación al disminuir la expresión de los genes DNMT3B y MBD1 [216]. GO podría activar la vía de regulación miRNA-360 para suprimir la cascada de señalización de daño-apoptosis del ADN al afectar al componente de CEP-1 [218]. En conjunto, estos datos sugieren que GFNs podrían causar cambios sutiles en la programación de la expresión génica modulando los cambios epigenéticos. Sin embargo, estudios de los cambios epigenéticos inducidos por los GFNs son escasos, y no se entiende completamente el mecanismo epigenético causado por la exposición a GFNs.

Para concluir, muchos estudios han discutido los mecanismos representativos de la toxicidad de GFNs que implican cuatro vías de señalización: TLR, TGF- β , TNF- α y MAPK. Estas cuatro vías de señalización son correlativas y intermodulatorias, lo que hace que la respuesta inflamatoria, la autofagia, la apoptosis y otros mecanismos sean independientes y, sin embargo, conectados entre sí. Además, el estrés oxidativo parece desempeñar el papel más importante en la activación de estas vías de señalización. Se ha informado de que hay intersecciones de apoptosis, autofagia y necrosis en estudios de toxicidad de otros nanomateriales, que inhiben o promueven mutuamente en algunas condiciones. Sin embargo, las vías de señalización de la toxicidad de GFNs investigadas en documentos hasta la fecha son solo una pequeña parte de una intrincada red, y deben ser exploradas en detalle en el futuro.

Espacios en los datos y estudios futuros

Actualmente, la literatura es insuficiente para sacar conclusiones sobre los potenciales peligros de GFNs. Han comenzado a surgir dos opiniones opuestas: algunos investigadores sugirieron que los materiales de grafeno son biocompatibles en una serie de estudios centrados en aplicaciones biomédicas [119, 154, 162, 219], y otros estudios informaron de respuestas biológicas adversas y citotoxicidad [32, 118, 135, 138, 192]. Estos resultados inconsistentes podrían haber sido causados por varios factores, incluidos los diferentes grupos de investigación, varios modelos celulares o animales y las diferentes caracterizaciones fisicoquímicas de GFNs. Cuando se exploran GFNs para aplicaciones in vivo en el cuerpo humano o en algunas otras aplicaciones biomédicas, se debe considerar la biocompatibilidad y se necesitan estudios más detallados y precisos de toxicidad.

En primer lugar, la caracterización fisicoquímica detallada es imprescindible en futuros estudios de toxicidad de GFNs. En los experimentos, las descripciones de las características de GFNs deben incluir su tamaño, morfología, área superficial, carga, modificaciones superficiales, pureza y aglomeración [88, 141, 148, 162]. Debido a que estos factores fisicoquímicos influyen en gran medida

en la toxicidad y biocompatibilidad de GFNs, diseños experimentales deben considerar un solo factor y excluir otros factores interferentes. También se deben proporcionar detalles del proceso de fabricación porque los residuos oxidativos formados podrían alterar en gran medida la estructura superficial del grafeno y el GO durante la funcionalización [151]. Es importante destacar la necesidad de establecer un único método universal en la tecnología del grafeno, que permita una mejor comparación de los datos de diferentes estudios o laboratorios.

En segundo lugar, diferentes criterios de observación, parámetros y selección de métodos experimentales podrían inducir grandes variaciones entre laboratorios [220, 221]. Por ejemplo, los ensayos del MTT siempre no predicen con exactitud la toxicidad del grafeno porque la reducción espontánea da lugar a una señal de falsos positivos. Por lo tanto, se deben utilizar evaluaciones alternativas apropiadas, como el reactivo salino de tetrazolio soluble en agua (WST-8), el ensayo ROS y la prueba de exclusión azul de tripano [106, 222]. Además, el ensayo de cometas a menudo muestra niveles más altos de daño en el ADN que el ensayo de micronúcleos porque el primero mide la lesión reparable y el segundo mide el daño genético que queda después de la división celular [159, 223]. Por lo tanto, se requiere precaución al elegir el ensayo más adecuado para evaluar la toxicidad de los materiales de grafeno y evitar resultados falsos positivos.

En tercer lugar, la selección de líneas celulares es de vital importancia porque las líneas celulares cancerosas tienden a ser sensibles o resistentes dependiendo de sus antecedentes genéticos. Las mismas nanopartículas de grafeno pueden causar diferentes reacciones dependiendo de diversos orígenes celulares. Se deben utilizar líneas celulares adecuadas con buena estabilidad para evitar resultados falsos positivos o negativos. Las células primarias derivadas de humanos o animales pueden simular mejor las condiciones de salud de los seres humanos. Se ha utilizado una gran cantidad de células primarias para probar la toxicidad de otros nanomateriales [224-228], pero el cultivo de células primarias es extremadamente raro en los experimentos con GFNs hasta la fecha [210, 229]. Se deben realizar varios experimentos celulares combinados con células primarias para evaluar exhaustivamente las propiedades fisicoquímicas y la toxicidad de los GFNs.

En cuarto lugar, la vía de administración de GFNs desempeña un papel muy importante en los estudios de toxicidad, y diferentes métodos de administración darán lugar a diferentes reacciones toxicológicas [32, 53]. Por lo tanto, la ruta y el período de exposición deben elegirse cuidadosamente de acuerdo con el objetivo del estudio. La administración de fármacos nasales se utiliza a menudo para estudiar la neurotoxicidad de los nanomateriales [230, 231], pero este método de administración rara vez se ha aplicado en las pruebas de toxicidad de los GFNs. Estudios toxicológicos de GFNs en el sistema nervioso son raros, y el mecanismo no está claro y debe estudiarse más a fondo en el futuro. Recientes estudios toxicocinéticos que involucran la absorción, distribución, metabolismo, acumulación y excreción de GFNs a través de diferentes

rutas de exposición han dado algunos resultados, pero están lejos de ser suficientes para aclarar los complejos mecanismos internos. Por ejemplo, se necesitan más estudios para comprender los mecanismos moleculares específicos de GFNs que pasan a través de las barreras fisiológicas y la cantidad de acumulación o el período de excreción de GFNs en los tejidos. Además, dado el aumento de la exposición de los seres humanos a GFNs, la evaluación de la toxicidad sistémica en el cuerpo humano es indispensable en futuros estudios.

En quinto lugar, otra cuestión importante que requiere atención es el destino a largo plazo de GFNs después de entrar en el cuerpo o ser absorbidos por las células. Los estudios más recientes han consistido en evaluaciones de toxicidad a corto plazo [89, 232], y las lesiones tóxicas a largo plazo no han recibido mucha atención desde la aplicación generalizada de GFNs en 2008. Además, la superficie de grafeno funcionalizada puede mejorar su biocompatibilidad, pero se debe considerar la estabilidad a largo plazo de los recubrimientos superficiales [233]. Si los recubrimientos superficiales se descomponieran, su toxicidad podría ser significativamente diferente de los resultados de exposición a corto plazo. Se necesitan estudios ampliados para determinar si los tiempos de tratamiento más largos influyen en el potencial nanotóxico de GFNs.

En sexto lugar, es necesario descubrir y dilucidar vías de señalización más específicas en el mecanismo de toxicidad de GFNs. Actualmente, se han ilustrado y aceptado ampliamente varios mecanismos de toxicidad típicos de GFNs, como estrés oxidativo, apoptosis y autofagia. Sin embargo, estos mecanismos solo se han descrito en términos generales, y es necesario investigar en detalle las vías de señalización específicas de estos mecanismos. Las vías de señalización implicadas en la toxicidad de otros nanomateriales también pueden ser relevantes en el estudio de GFNs. Por lo tanto, se deben detectar más vías de señalización en futuras investigaciones. Por ejemplo, se ha considerado en numerosos estudios de nanomateriales la nanoepigenética, lo que también es útil para evaluar la toxicidad limitada y los efectos secundarios de GFNs. En recientes estudios se han demostrado que GFNs podrían causar cambios epigenéticos y genómicos que podrían estimular la toxicidad física y la carcinogenicidad [234]. GFNs tienen áreas de superficie elevadas, superficies continuas lisas y biopersistencia, similares a las propiedades de los implantes tumorígenos de estado sólido. Se desconoce si GFNs tienen el potencial de inducir sarcomas de cuerpos extraños y, por lo tanto, se deben realizar estudios definitivos de las potencialidades tumorales o los riesgos del grafeno lo antes posible.

Conclusiones

En los últimos años, se han utilizado GFNs ampliamente en variada gama de campos tecnológicos y biomédicos. Actualmente, la mayoría de los experimentos se han centrado en la toxicidad de GFNs en los pulmones y hígado. Por lo tanto, los estudios de lesión cerebral o neurotoxicidad merecen más atención

en el futuro. Muchos experimentos han demostrado que GFNs tienen efectos secundarios tóxicos en muchas aplicaciones biológicas, pero se necesita urgentemente un estudio en profundidad de los mecanismos de toxicidad. Además, los resultados contrastantes con respecto a la toxicidad de GFNs deben abordarse mediante métodos experimentales eficaces y estudios sistemáticos. Esta revisión proporciona una visión general de la toxicidad de GFNs resumiendo toxicocinética, mecanismos de toxicidad y factores de influencia, y tiene como objetivo proporcionar información para facilitar una investigación exhaustiva sobre hemocompatibilidad *in vitro* e *in vivo* y biocompatibilidad de GFNs en el futuro. Esta revisión ayudará a abordar los problemas de seguridad antes de las aplicaciones clínicas y terapéuticas de GFNs, que serán importantes para un mayor desarrollo de GFNs en aplicaciones biológicas.

Abreviaturas

AM: Macrófagos alveolares; BBB: barrera hematoencefálica; BEB: Barreras sangre-epidimo; BTB: barrera sangre-testículos; CR: receptor del complemento; FcγR: receptor de Fcγ; FLG: grafeno de pocas capas; GFNs: nanomateriales de la familia del grafeno; GNS: nanoláminas/nanohojas de grafeno; GO: óxido de grafeno; GO-COOH: óxido de grafeno carboxilado; GO-DEX: GO-dextran; GO-MB: GO-molecular beacon; GO-NH₂: GO aminado; GO-PAA: GO funcionalizado poli(ácido acrílico); GO-PAM: GO funcionalizado con poli(acrilamida); GO-PEG: Derivados de PEGylated GO; GO-PEI: GO-polietilenimina; GQD: puntos cuánticos de grafeno; GSH-PX: glutatión peroxidasa; GXVG: Carboxil grafeno; LDH: Lactato y deshidrogenasa; MALDI: Desorción/ionización láser asistida por matriz; MAPKs: Proteína quinasa activada por mitógenos; MDA: Malondialdehído; MØ: Macrófago; MR: Receptor de manosa; MSI: Imágenes de espectrometría de masas; Células PC12: células de feocromocitoma de rata; PCGO: nanopartículas de óxido de grafeno recubiertas de proteínas; PrGO: Óxido de grafeno reducido PEGilado; RES: Sistema reticuloendotelial; rGO: Óxido de grafeno reducido; ROS: Especies reactivas de oxígeno; SOD: Superóxido dismutasa; TLR: Receptor similar al peaje

Artículo Original

Publicado online: 31 de octubre de 2016, por *Particle and Fibre Toxicology*

Link: <https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12989-016-0168-y>

Creative Commons permiso añadido al artículo: https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/deed.es_ES

Referencias

- Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, Jiang D, Zhang Y, Dubonos SV, et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*. 2004; 306(5696):666–9.
- Sanchez VC, Jachak A, Hurt RH, Kane AB. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review. *Chem Res Toxicol*. 2012;25(1):15–34.
- Yang XY, Wang YS, Huang X, Ma YF, Huang Y, Yang RC, et al. Multi-functionalized graphene oxide based anticancer drug-carrier with dual-targeting function and pH-sensitivity. *J Mat Chem*. 2011;21(10):3448–54.
- Park S, An J, Jung I, Piner RD, An SJ, Li X, et al. Colloidal suspensions of highly reduced graphene oxide in a wide variety of organic solvents. *Nano Lett*. 2009;9(4):1593–7.
- Geim AK. Graphene: status and prospects. *Science*. 2009;324(5934):1530–4.
- Guo X, Mei N. Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials. *J Food Drug Anal*. 2014;22(1):105–15.
- Seabra AB, Paula AJ, de Lima R, Alves OL, Duran N. Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. *Chem Res Toxicol*. 2014;27(2):159–68.
- Shen H, Zhang L, Liu M, Zhang Z. Biomedical applications of graphene. *Theranostics*. 2012;2(3):283–94.
- Han U, Seo Y, Hong J. Effect of pH on the structure and drug release profiles of layer-by-layer assembled films containing polyelectrolyte, micelles, and graphene oxide. *Sci Rep*. 2016;6(2045–2322 (Electronic)):24158.
- Wang H, Liang Y, Mirfakhrai T, Chen Z, Casalongue HS, Dai H. Advanced asymmetrical supercapacitors based on graphene hybrid materials. *Nano Res*. 2011;4(8):729–36.
- Loh KP, Bao Q, Eda G, Chhowalla M. Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. *Nat Chem*. 2010;2(12):1015–24.
- Wang D, Zhu L, Chen JF, Dai L. Mn3O4-graphene hybrid as a high-capacity anode material for lithium ion batteries. *J Am Chem Soc*. 2015;132(1520–5126 (Electronic)):13978–80.
- Gurunathan S, Han JW, Dayem AA, Eppakayala V, Kim JH. Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Nanomed*. 2012;7(1178–2013 (Electronic)):e14.
- Zhan S, Zhu D, Ma S, Yu W, Jia Y, Li Y, et al. Highly efficient removal of pathogenic bacteria with magnetic graphene composite. *ACS Appl Mater Interf*. 2015;7(1944–8252 (Electronic)):4290–8.
- Yang HW, Hua MY, Chen SL, Tsai RY. Reusable sensor based on high magnetization carboxyl-modified graphene oxide with intrinsic hydrogen peroxide catalytic activity for hydrogen peroxide and glucose detection. *Biosens Bioelectron*. 2013;41:172–9.
- Wang Y, Yuan R, Chai Y, Yuan Y, Bai L. In situ enzymatic silver enhancement based on functionalized graphene oxide and layer-by-layer assembled gold nanoparticles for ultrasensitive detection of thrombin. *Biosens Bioelectron*. 2012;38(1):50–4.
- Huang J, Zhang L, Liang RP, Qiu JD. “On-off” switchable electrochemical affinity nanobiosensor based on graphene oxide for ultrasensitive glucose sensing. *Biosens Bioelectron*. 2013;41:430–5.
- Gao L, Lian C, Zhou Y, Yan L, Li Q, Zhang C, et al. Graphene oxide-DNA based sensors. *Biosens Bioelectron*. 2014;60(1873–4235 (Electronic)):22–9.
- Chen ML, Liu JW, Hu B, Chen ML, Wang JH. Conjugation of quantum dots with graphene for fluorescence imaging of live cells. *Analyst*. 2011;136(20):4277–83.
- Wang Y, Wang H, Liu D, Song S, Wang X, Zhang H. Graphene oxide covalently grafted upconversion nanoparticles for combined NIR mediated imaging and photothermal/photodynamic cancer therapy. *Biomaterials*. 2013;34(1878–5905 (Electronic)):7715–24.
- Pan Y, Sahoo NG, Li L. The application of graphene oxide in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2012;9(11):1365–76.
- Huiyun W, Chunyan D, Haiqing D, Aijun S, Wenjuan X, Xiaojun C, et al. Engineered redox-responsive PEG detachment mechanism in PEGylated nano-graphene oxide for intracellular drug delivery. *Small*. 2012;8(5):760–9.
- Yang X, Qiu L, Cheng C, Wu Y, Ma ZF, Li D. Ordered gelation of chemically converted graphene for next-generation electroconductive hydrogel films. *Angewandte Chem Int Ed Engl*. 2011;50(32):7325–8.
- Schinwald A, Murphy FA, Jones A, Macnee W, Donaldson K. Graphene-based nanoplatelets: a new risk to the respiratory system as a consequence of their unusual aerodynamic properties. *ACS Nano*. 2012;6(1):736–46.
- Chaenyung C, Ryon SS, Xiguang G, Nasim A, Dokmeci MR, Xiaowu Shirley T, et al. Controlling mechanical properties of cell-laden hydrogels by covalent incorporation of graphene oxide. *Small*. 2014;10(3):514–23.
- Arvidsson R, Molander S, Sandén BA. Review of potential environmental and health risks of the nanomaterial graphene. *Hum Ecol Risk Assess*. 2013;19(4):873–87.
- Lee JH, Han JH, Kim JH, Kim B, Bello D, Kim JK, et al. Exposure monitoring of graphene nanoplatelets manufacturing workplaces. *Inhal Toxicol*. 2016;28(6):281–91.
- Maynard RL. Nano-technology and nano-toxicology. *Emerg Health Threats J*. 2012;5.
- Su WC, Ku BK, Kulkarni P, Cheng YS. Deposition of graphene nanomaterial aerosols in human upper airways. *J Occup Environ Hyg*. 2015;13(1):1–34.
- Li B, Yang J, Huang Q, Zhang Y, Peng C, Zhang Y, et al. Biodistribution and pulmonary toxicity of intratracheally instilled graphene oxide in mice. *NPG Asia Mater*. 2013;5:E44.
- Yang K, Gong H, Shi X, Wan J, Zhang Y, Liu Z. In vivo biodistribution and toxicology of functionalized nano-graphene oxide in mice after oral and intraperitoneal administration. *Biomaterials*. 2013;34(11):2787–95.
- Wen KP, Chen YC, Chuang CH, Chang HY, Lee CY, Tai NH. Accumulation and toxicity of intravenously-injected functionalized graphene oxide in mice. *J Appl Toxicol*. 2015;35(10):1211–8.
- Kurantowicz N, Strojny B, Sawosz E, Jaworski S, Kutwin M, Grodzik M, et al. Biodistribution of a high dose of diamond, graphite, and graphene oxide nanoparticles after multiple intraperitoneal injections in rats. *Nanoscale Res Lett*. 2015;10(1):398.
- Yue H, Wei W, Yue Z, Wang B, Luo N, Gao Y, et al. The role of the lateral dimension of graphene oxide in the regulation of cellular responses. *Biomaterials*. 2012;33(16):4013–21.
- Nezakati T, Cousins BG, Seifalian AM. Toxicology of chemically modified graphene-based materials for medical application. *Arch Toxicol*. 2014;88(11):1987–2012.
- Chng ELK, Pumera M. Toxicity of graphene related materials and transition metal dichalcogenides. *Rsc Advances*. 2015;5(4):3074–80.
- Zheng XT, Ananthanarayanan A, Luo KQ, Chen P. Glowing graphene quantum dots and carbon dots: properties, syntheses, and biological applications. *Small*. 2015;11(1613–6829 (Electronic)):1620–36.
- Caffo M, Merlo L, Marino D, Caruso G. Graphene in neurosurgery: the beginning of a new era. *Nanomed*. 2015;10:615–25.
- Wu SY, An SS, Hulme J. Current applications of graphene oxide in nanomedicine. *Int J Nanomed*. 2015;10(Spec Iss):9–24.
- Tonelli FMP, Goulart VAM, Gomes KN, Ladeira MS, Santos AK, Lorencon E, et al. Graphene-based nanomaterials: biological and medical applications and toxicity. *Nanomedicine*. 2015;10(15):2423–50.
- Zhou R, Gao H. Cytotoxicity of graphene: recent advances and future perspective. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2014;6(5):452–74.
- Ema M, Hougaard KS, Kishimoto A, Honda K. Reproductive and developmental toxicity of carbon-based nanomaterials: A literature review. *Nanotoxicology*. 2015;10:391–412.
- Jastrzebska AM, Olszyna AR. The ecotoxicity of graphene family materials: current status, knowledge gaps and future needs. *J Nanopart Res*. 2015; 17(1):1–21.
- Xu S, Zhang Z, Chu M. Long-term toxicity of reduced graphene oxide nanosheets: Effects on female mouse reproductive ability and offspring development. *Biomaterials*. 2015;54:188–200.
- Jennifer M, Maciej W. Nanoparticle technology as a double-edged sword: cytotoxic, genotoxic and epigenetic effects on living cells. *J Biomater Nanobiotechnol*. 2013;4:53–63.
- Wu W, Yan L, Wu Q, Li Y, Li Q, Chen S, et al. Evaluation of the toxicity of graphene oxide exposure to the eye. *Nanotoxicology*. 2016;10(9):1329–40.
- Lee K, Jeong Y, Bae J, Seok H, Yang Y, Roh S, et al. The role of surface functionalization on the pulmonary inflammogenicity and translocation into mediastinal lymph nodes of graphene nanoplatelets in rats. *Arch Toxicol*. 2016;1–10.
- Schinwald A, Murphy F, Askounis A, Koutsos V, Sefiane K, Donaldson K, et al. Minimal oxidation and inflammogenicity of pristine graphene with residence in the lung. *Nanotoxicology*. 2013;8(8):824–32.
- Zhang X, Yin J, Peng C, Hu W, Zhu Z, Li W, et al. Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration. *Carbon*. 2011;49(3):986–95.
- Singh SK, Singh MK, Nayak MK, Kumari S, Shrivastava S, Gracio JJ, et al. Thrombus inducing property of atomically thin graphene oxide sheets. *ACS Nano*. 2011;5(6):4987–96.

51. Gurunathan S, Han JW, Eppakayala V, Kim JH. Biocompatibility of microbially reduced graphene oxide in primary mouse embryonic fibroblast cells. *Colloids Surf B Biointerf.* 2013;105:58–66.
52. Yang K, Wan J, Zhang S, Zhang Y, Lee ST, Liu Z. In vivo pharmacokinetics, long-term biodistribution, and toxicology of PEGylated graphene in mice. *ACS Nano.* 2011;5(1):516–22.
53. Fu C, Liu T, Li L, Liu H, Liang Q, Meng X. Effects of graphene oxide on the development of offspring mice in lactation period. *Biomaterials.* 2015;40:23–31.
54. Hu Q, Jiao B, Shi X, Valle RP, Zuo YY, Hu G. Effects of graphene oxide nanosheets on the ultrastructure and biophysical properties of the pulmonary surfactant film. *Nanoscale.* 2015;7(43):18025–9.
55. Gosens I, Post JA, de la Fonteyne LJ, Jansen EH, Geus JW, Cassee FR, et al. Impact of agglomeration state of nano- and submicron sized gold particles on pulmonary inflammation. *Part Fibre Toxicol.* 2010;7(1743–8977 (Electronic)):1.
56. Geiser M, Kreyling WG. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* 2010;7:2.
57. Ruge CA, Schaefer UF, Herrmann J, Kirch J, Canadas O, Echaide M, et al. The interplay of lung surfactant proteins and lipids assimilates the macrophage clearance of nanoparticles. *PLoS One.* 2012;7(7):e40775.
58. Morfeld P, Treumann S, Ma-Hock L, Bruch J, Landsiedel R. Deposition behavior of inhaled nanostructured TiO₂ in rats: fractions of particle diameter below 100 nm (nanoscale) and the slicing bias of transmission electron microscopy. *Inhal Toxicol.* 2012;24(1091–7691 (Electronic)):939–51.
59. Wiemann M, Vennemann A, Sauer UG, Wiench K, Ma-Hock L, Landsiedel R. An in vitro alveolar macrophage assay for predicting the short-term inhalation toxicity of nanomaterials. *J Nanobiotechnol.* 2016;14(1477–3155 (Electronic)):1.
60. Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Takenaka S, Möller W. Differences in the biokinetics of inhaled nano- versus micrometer-sized particles. *Accounts Chem Res.* 2012;46(1520–4898 (Electronic)):714–22.
61. Liang M, Hu M, Pan B, Xie Y, Petersen EJ. Biodistribution and toxicity of radio-labeled few layer graphene in mice after intratracheal instillation. *Part Fibre Toxicol.* 2016;13(1):1–12.
62. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010;37(1):13–25.
63. Mendonca MC, Soares ES, de Jesus MB, Ceragioli HJ, Ferreira MS, Catharino RR, et al. Reduced graphene oxide induces transient blood–brain barrier opening: an in vivo study. *J Nanobiotechnol.* 2015;13:78.
64. Liu Y, Xu LP, Dai W, Dong H, Wen Y, Zhang X. Graphene quantum dots for the inhibition of beta amyloid aggregation. *Nanoscale.* 2015;7(45):19060–5.
65. Mital P, Hinton BT, Dufour JM. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol Reprod.* 2011;84(5):851–8.
66. Liang S, Xu S, Zhang D, He J, Chu M. Reproductive toxicity of nanoscale graphene oxide in male mice. *Nanotoxicology.* 2015;9(1):92–105.
67. Buerkithurnherr T, Von MU, Wick P. Knocking at the door of the unborn child: engineered nanoparticles at the human placental barrier. *Swiss Med Wkly.* 2012;142:w13559.
68. Yang H, Sun C, Fan Z, Tian X, Yan L, Du L, et al. Effects of gestational age and surface modification on materno-fetal transfer of nanoparticles in murine pregnancy. *Sci Rep.* 2012;2(46):847.
69. Huang X, Zhang F, Sun X, Choi KY, Niu G, Zhang G, et al. The genotype-dependent influence of functionalized multiwalled carbon nanotubes on fetal development. *Biomaterials.* 2014;35(2):856–65.
70. Qi W, Bi J, Zhang X, Wang J, Wang J, Liu P, et al. Damaging effects of multi-walled carbon nanotubes on pregnant mice with different pregnancy times. *Sci Rep.* 2014;4(3):doi: 10.1038/srep04352.
71. Du J, Wang S, You H, Jiang R, Zhuang C, Zhang X. Developmental toxicity and DNA damage to zebrafish induced by perfluorooctane sulfonate in the presence of ZnO nanoparticles. *Environ Toxicol.* 2014;31(1522–7278 (Electronic)):360–71.
72. Zhou Z, Son J, Harper B, Zhou Z, Harper S. Influence of surface chemical properties on the toxicity of engineered zinc oxide nanoparticles to embryonic zebrafish. *Beilstein J Nanotechnol.* 2015;6(2190–4286 (Electronic)):1568–79.
73. Rollerova E, Tulinska J, Liskova A, Kuricova M, Kovriznyh J, Mlynarcikova A, et al. Titanium dioxide nanoparticles: some aspects of toxicity/focus on the development. *Endocr Reg.* 2014;49(1210–0668 (Print)):97–112.
74. Warheit DB, Boatman R, Brown SC. Developmental toxicity studies with 6 forms of titanium dioxide test materials (3 pigment-different grade & 3 nanoscale) demonstrate an absence of effects in orally-exposed rats. *Reg Toxicol Pharmacol.* 2015;73(1096–0295 (Electronic)):887–96.
75. Ema M, Gamo M, Honda K. Developmental toxicity of engineered nanomaterials in rodents. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015;299(1096–0333 (Electronic)):47–52.
76. Li Z, Geng Y, Zhang X, Qi W, Fan Q, Li Y, et al. Biodistribution of co-exposure to multi-walled carbon nanotubes and graphene oxide nanoplatelets radiotracers. *J Nanopart Res.* 2011;13(7):2939–47.
77. Wang Y, Li Z, Hu D, Lin CT, Li J, Lin Y. Aptamer/graphene oxide nanocomplex for in situ molecular probing in living cells. *J Am Chem Soc.* 2010;132(27):9274–6.
78. Liu JH, Yang ST, Wang H, Chang Y, Cao A, Liu Y. Effect of size and dose on the biodistribution of graphene oxide in mice. *Nanomedicine.* 2012;7(12):1801–12.
79. Zhang S, Yang K, Feng L, Liu Z. In vitro and in vivo behaviors of dextran functionalized graphene. *Carbon.* 2011;49(12):4040–9.
80. Hirn S, Semmler-Behnke M, Schleh C, Wenk A, Lipka J, Schaffler M, et al. Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;77(3):407–16.
81. Li B, Zhang XY, Yang JZ, Zhang YJ, Li WX, Fan CH, et al. Influence of polyethylene glycol coating on biodistribution and toxicity of nanoscale graphene oxide in mice after intravenous injection. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:4697–707.
82. Zhang Y, Ali SF, Dervishi E, Xu Y, Li Z, Casciano D, et al. Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural phaeochromocytoma-derived PC12 cells. *ACS Nano.* 2010;4(6):3181–6.
83. Li Y, Liu Y, Fu Y, Wei T, Le Guyader L, Gao G, et al. The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways. *Biomaterials.* 2012;33(2):402–11.
84. Sydlík SA, Jhunjhunwala S, Webber MJ, Anderson DG, Langer R. In vivo compatibility of graphene oxide with differing oxidation states. *ACS Nano.* 2015;9(4):3866–74.
85. Mytych J, Wnuk M. Nanoparticle technology as a double-edged sword: cytotoxic, genotoxic and epigenetic effects on living cells. *J Biomater Nanobiotechnol.* 2013;4:53–63.
86. Peng C, Hu W, Zhou Y, Fan C, Huang Q. Intracellular imaging with a graphene-based fluorescent probe. *Small.* 2010;6(15):1686–92.
87. Wang D, Zhu L, Chen JF, Dai L. Can graphene quantum dots cause DNA damage in cells? *Nanoscale.* 2015;7(21):9894–901.
88. Mu Q, Su G, Li L, Gilbertson BO, Yu LH, Zhang Q, et al. Size-dependent cell uptake of protein-coated graphene oxide nanosheets. *ACS Appl Mater Interf.* 2012;4(4):2259–66.
89. Xu M, Zhu J, Wang F, Xiong Y, Wu Y, Wang Q, et al. Improved in vitro and in vivo biocompatibility of graphene oxide through surface modification: poly(acrylic acid)-functionalization is superior to PEGylation. *ACS Nano.* 2016;10:3267–81.
90. Kostarelos K, Novoselov KS. Materials science. Exploring the interface of graphene and biology. *Science.* 2014;344(6181):261–3.
91. Sasidharan A, Panchakarla LS, Chandran P, Menon D, Nair S, Rao CN, et al. Differential nano-bio interactions and toxicity effects of pristine versus functionalized graphene. *Nanoscale.* 2011;3(6):2461–4.
92. Li Y, Yuan H, von dem Bussche A, Creighton M, Hurt RH, Kane AB, et al. Graphene microsheets enter cells through spontaneous membrane penetration at edge asperities and corner site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(1091–6490 (Electronic)):12295–300.
93. Qu G, Liu S, Zhang S, Wang L, Wang X, Sun B, et al. Graphene oxide induces toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent necrosis in macrophages. *ACS Nano.* 2013;7(7):5732–45.
94. Ma J, Liu R, Wang X, Liu Q, Chen Y, Valle RP, et al. Crucial role of lateral size for graphene oxide in activating macrophages and stimulating Pro-inflammatory responses in cells and animals. *ACS Nano.* 2015;9(10):10498–515.
95. Mao L, Hu M, Pan B, Xie Y, Petersen EJ. Biodistribution and toxicity of radio-labeled few layer graphene in mice after intratracheal instillation. *Part Fibre Toxicol.* 2016;13(1743–8977 (Electronic)):1.
96. Park EJ, Lee SJ, Lee K, Choi YC, Lee BS, Lee GH, et al. Pulmonary persistence of graphene nanoplatelets may disturb physiological and immunological homeostasis. *J Appl Toxicol.* 2016.
97. Kim JK, Shin JH, Lee JS, Hwang JH, Lee JH, Baek JE, et al. 28-Day inhalation toxicity of graphene nanoplatelets in Sprague–Dawley rats. *Nanotoxicology.* 2016;10(7):891–901.
98. Singh SK, Singh MK, Kulkarni PP, Sonkar VK, Gracio JJ, Dash D. Amine-modified graphene: thrombo-protective safer alternative to graphene oxide for biomedical applications. *ACS Nano.* 2012;6(3):2731–40.

99. Duch MC, Budinger GR, Liang YT, Soberanes S, Ulrich D, Chiarella SE, et al. Minimizing oxidation and stable nanoscale dispersion improves the biocompatibility of graphene in the lung. *Nano Lett.* 2011;11(12):5201–7.
100. Wang X, Duch MC, Mansukhani N, Ji Z, Liao YP, Wang M, et al. Use of a pro-fibrogenic mechanism-based predictive toxicological approach for tiered testing and decision analysis of carbonaceous nanomaterials. *ACS Nano.* 2015;9(1936-086X (Electronic)):3032–43.
101. Sawosz E, Jaworski S, Kutwin M, Hotowy A, Wierzbicki M, Grodzik M, et al. Toxicity of pristine graphene in experiments in a chicken embryo model. *Int J Nanomed.* 2014;9:3913–22.
102. Liu XT, Mu XY, Wu XL, Meng LX, Guan WB, Ma YQ, et al. Toxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and reduced graphene oxide to zebrafish embryos. *Biomed Environ Sci.* 2014;27(9):676–83.
103. Chen Y, Hu X, Sun J, Zhou Q. Specific nanotoxicity of graphene oxide during zebrafish embryogenesis. *Nanotoxicology.* 2016;10(1):42–52.
104. Sasidharan A, Panchakarla LS, Sadanandan AR, Ashokan A, Chandran P, Girish CM, et al. Hemocompatibility and macrophage response of pristine and functionalized graphene. *Small.* 2012;8(8):1251–63.
105. Ding Z, Zhang Z, Ma H, Chen Y. In vitro hemocompatibility and toxic mechanism of graphene oxide on human peripheral blood T lymphocytes and serum albumin. *ACS Appl Mater Interf.* 2014;6(22):19797–807.
106. Liao KH, Lin YS, Macosko CW, Haynes CL. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2011;3(7):2607–15.
107. Kouhi SMM, Lahouti M, Ganjeali A, Entezari MH. Long-term exposure of rapeseed (*Brassica napus* L.) to ZnO nanoparticles: anatomical and ultrastructural responses. *Environ Sci Pollut Res.* 2015;22(1614–7499 (Electronic)):10733–43.
108. Vales G, Rubio L, Marcos R. Long-term exposures to low doses of titanium dioxide nanoparticles induce cell transformation, but not genotoxic damage in BEAS-2B cells. *Nanotoxicology.* 2015;9(1743–5404 (Electronic)):568–78.
109. Sancey L, Kotb S, Truillet C, Appaix F, Marais A, Thomas E, et al. Long-term in vivo clearance of gadolinium-based AGuX nanoparticles and their biocompatibility after systemic injection. *ACS Nano.* 2015;9(1936-086X (Electronic)):2477–88.
110. Chatterjee N, Eom HJ, Choi J. A systems toxicology approach to the surface functionality control of graphene-cell interactions. *Biomaterials.* 2014;35:1109–27.
111. Jaworski S, Sawosz E, Grodzik M, Winnicka A, Prasek M, Wierzbicki M, et al. In vitro evaluation of the effects of graphene platelets on glioblastoma multiforme cells. *Int J Nanomed.* 2013;8:413–20.
112. Liu Y, Luo Y, Wu J, Wang Y, Yang X, Yang R, et al. Graphene oxide can induce in vitro and in vivo mutagenesis. *Sci Rep.* 2013;3:3469.
113. Vallabani NV, Mittal S, Shukla RK, Pandey AK, Dhakate SR, Pasricha R, et al. Toxicity of graphene in normal human lung cells (BEAS-2B). *J Biomed Nanotechnol.* 2011;7(1):106–7.
114. Peng J, Gao W, Gupta BK, Liu Z, Romero-Aburto R, Ge L, et al. Graphene quantum dots derived from carbon fibers. *Nano Lett.* 2012;12(1530–6992 (Electronic)):844–9.
115. Shang W, Zhang X, Zhang M, Fan Z, Sun Y, Han M, et al. The uptake mechanism and biocompatibility of graphene quantum dots with human neural stem cells. *Nanoscale.* 2014;6(2040–3372 (Electronic)):5799–806.
116. Zhang L, Xia J, Zhao Q, Liu L, Zhang Z. Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs. *Small.* 2010;6(4):537–44.
117. Ruiz ON, Fernando KA, Wang B, Brown NA, Luo PG, McNamara ND, et al. Graphene oxide: a nonspecific enhancer of cellular growth. *ACS Nano.* 2011;5(10):8100–7.
118. Akhavan O, Ghaderi E, Akhavan A. Size-dependent genotoxicity of graphene nanoplatelets in human stem cells. *Biomaterials.* 2012;33(32):8017–25.
119. Chang Y, Yang ST, Liu JH, Dong E, Wang Y, Cao A, et al. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicol Lett.* 2011;200(3):201–10.
120. Zhang X, Hu W, Li J, Tao L, Wei Y. A comparative study of cellular uptake and cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and nanodiamond. *Toxicol Res.* 2012;1(1):62–8.
121. Lu CH, Zhu CL, Li J, Liu JJ, Chen X, Yang HH. Using graphene to protect DNA from cleavage during cellular delivery. *Chem Commun.* 2010;46(1364-548X (Electronic)):3116–8.
122. De Marzi L, Ottaviano L, Perrozzi F, Nardone M, Santucci S, De Lapuente J, et al. Flake size-dependent cyto and genotoxic evaluation of graphene oxide on in vitro A549, CaCo2 and vero cell lines. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2014;28(2):281–9.
123. Lv M, Zhang Y, Liang L, Wei M, Hu W, Li X, et al. Effect of graphene oxide on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells line. *Nanoscale.* 2012;4(13):3861–6.
124. Reshma SC, Syama S, Mohanan PV. Nano-biointeractions of PEGylated and bare reduced graphene oxide on lung alveolar epithelial cells: A comparative in vitro study. *Colloids Surf B Biointerf.* 2016;140(1873–4367 (Electronic)):104–16.
125. Rana VK, Choi MC, Kong JY, Kim GY, Mi JK, Kim SH, et al. Synthesis and drug-delivery behavior of chitosan-functionalized graphene oxide hybrid nanosheets. *Macromol Mater Eng.* 2011;296(2):131–40.
126. Yang K, Li Y, Tan X, Peng R, Liu Z. Behavior and toxicity of graphene and its functionalized derivatives in biological systems. *Small.* 2013;9(9–10):1492–503.
127. Yoon OJ, Kim I, Sohn IY, Kieu TT, Lee NE. Toxicity of graphene nanoflakes evaluated by cell-based electrochemical impedance biosensing. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102(7):2288–94.
128. Jastrzebska AM, Kurtycz P, Olszyna AR. Recent advances in graphene family materials toxicity investigations. *J Nanopart Res.* 2012;14(12):1320.
129. Misra SK, Kondaiah P, Bhattacharya S, Rao CN. Graphene as a nanocarrier for tamoxifen induces apoptosis in transformed cancer cell lines of different origins. *Small.* 2012;8(1):131–43.
130. Singh Z. Applications and toxicity of graphene family nanomaterials and their composites. *Nanotechnol Sci Appl.* 2016;9(1177–8903 (Electronic)):15.
131. Combarros RG, Collado S, Diaz M. Toxicity of graphene oxide on growth and metabolism of *Pseudomonas putida*. *J Hazard Mater.* 2016;310(1873–3336 (Electronic)):246–52.
132. Lee JK, Jeong AY, Bae J, Seok JH, Yang JY, Roh HS, et al. The role of surface functionalization on the pulmonary inflammogenicity and translocation into mediastinal lymph nodes of graphene nanoplatelets in rats. *Arch Toxicol.* 2016(1432–0738 (Electronic)):1–10. DOI: .1007/s00204-016-1706-y
133. Patlolla AK, Randolph J, Kumari SA, Tchounwou PB. Toxicity evaluation of graphene oxide in kidneys of Sprague–Dawley rats. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(1660–4601 (Electronic)):380.
134. Wang ZG, Zhou R, Jiang D, Song JE, Xu Q, Si J, et al. Toxicity of graphene quantum dots in zebrafish embryo. *Biomed Environ Sci.* 2015;28(0895–3988 (Print)):341–51.
135. Wang K, Jing R, Song H, Zhang J, Yan W, Guo S, et al. Biocompatibility of graphene oxide. *Nanoscale Res Lett.* 2010;6(1):1–8.
136. Hu W, Peng C, Luo W, Lv M, Li X, Li D, et al. Graphene-based antibacterial paper. *ACS Nano.* 2010;4(7):4317–23.
137. Dreyer DR, Park S, Bielawski CW, Ruoff RS. The chemistry of graphene oxide. *Chem Soc Rev.* 2010;39(1):228–40.
138. Mullick Chowdhury S, Lalwani G, Zhang K, Yang JY, Neville K, Sitharaman B. Cell specific cytotoxicity and uptake of graphene nanoribbons. *Biomaterials.* 2013;34(1):283–93.
139. Zhang H, Peng C, Yang J, Lv M, Liu R, He D, et al. Uniform ultrasmall graphene oxide nanosheets with low cytotoxicity and high cellular uptake. *ACS Appl Mater Interf.* 2013;5(5):1761–7.
140. Hasan SA, Rigueur JL, Hari RR, Krejci AJ, Isabel GJ, Rogers BR, et al. Transferable graphene oxide films with tunable microstructures. *ACS Nano.* 2010;4(12):7367–72.
141. Hsieh CT, Chen WY. Water/oil repellency and work of adhesion of liquid droplets on graphene oxide and graphene surfaces. *Surf Coat Technol.* 2011;205(19):4554–61.
142. Yang ST, Chang Y, Wang H, Liu G, Sheng C, Wang Y, et al. Folding/aggregation of graphene oxide and its application in Cu 2+ removal. *J Colloid Interf Sci.* 2010;351(1):122–7.
143. Bagri A, Mattevi C, Acik M, Chabal YJ, Chhowalla M, Shenoy VB. Structural evolution during the reduction of chemically derived graphene oxide. *Nat Chem.* 2010;2(7):581–7.
144. Hinzmann M, Jaworski S, Kutwin M, Jagiello J, Kozinski R, Wierzbicki M, et al. Nanoparticles containing allotropes of carbon have genotoxic effects on glioblastoma multiforme cells. *Int J Nanomed.* 2014;9:2409–17.
145. Jin C, Wang F, Tang Y, Zhang X, Wang J, Yang Y. Distribution of graphene oxide and TiO₂-graphene oxide composite in A549 cells. *Biol Trace Elem Res.* 2014;159(1–3):393–8.
146. Jarosz A, Skoda M, Dudek I, Szukiewicz D. Oxidative stress and mitochondrial activation as the main mechanisms underlying graphene toxicity against human cancer cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:5851035.
147. Ren H, Wang C, Zhang J, Zhou X, Xu D, Zheng J, et al. DNA cleavage system of nanosized graphene oxide sheets and copper ions. *ACS Nano.* 2010;4(12):7169–74.

148. Wang A, Pu K, Dong B, Liu Y, Zhang L, Zhang Z, et al. Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity and genotoxicity of graphene oxide towards human lung fibroblast cells. *J Appl Toxicol*. 2013;33(10):1156–64.
149. Jiang X, Dausend J, Hafner M, Musyanovych A, Rocker C, Landfester K, et al. Specific effects of surface amines on polystyrene nanoparticles in their interactions with mesenchymal stem cells. *Biomacromolecules*. 2010;11(3):748–53.
150. Yue ZG, Wei W, Lv PP, Yue H, Wang LY, Su ZG, et al. Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosan-based nanoparticles. *Biomacromolecules*. 2011;12(7):2440–6.
151. Zhang W, Wang C, Li Z, Lu Z, Li Y, Yin JJ, et al. Unraveling stress-induced toxicity properties of graphene oxide and the underlying mechanism. *Adv Mater*. 2012;24(39):5391–7.
152. Wojtoniszak M, Chen X, Kalenczuk RJ, Wajda A, Łapczuk J, Kurzewski M, et al. Synthesis, dispersion, and cytocompatibility of graphene oxide and reduced graphene oxide. *Colloids Surf B Biointerf*. 2011;89(1):79–85.
153. Hu H, Yu J, Li Y, Zhao J, Dong H. Engineering of a novel pluronic F127/graphene nanohybrid for pH responsive drug delivery. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100(1):141–8.
154. Sahu A, Choi WI, Tae G. A stimuli-sensitive injectable graphene oxide composite hydrogel. *Chem Commun (Camb)*. 2012;48(47):5820–2.
155. Yang K, Zhang S, Zhang G, Sun X, Lee ST, Liu Z. Graphene in mice: ultrahigh in vivo tumor uptake and efficient photothermal therapy. *Nano Lett*. 2010;10(9):3318–23.
156. Romero-Aburto R, Narayanan TN, Nagaoka Y, Hasumura T, Mitcham TM, Fukuda T, et al. Fluorinated graphene oxide; a new multimodal material for biological applications. *Adv Mater*. 2013;25(39):5632–7.
157. Feng L, Liu Z. Graphene in biomedicine: opportunities and challenges. *Nanomed (Lond)*. 2011;6(2):317–24.
158. Robinson JT, Tabakman SM, Liang Y, Wang H, Casalongue HS, Vinh D, et al. Ultrasmall reduced graphene oxide with high near-infrared absorbance for photothermal therapy. *J Am Chem Soc*. 2011;133(17):6825–31.
159. Singh N, Manshian B, Jenkins GJS, Griffiths SM, Williams PM, Maffei TGG, et al. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*. 2009;30(5):23–24:3891–914.
160. Yin PT, Shah S, Chhowalla M, Lee KB. Design, synthesis, and characterization of graphene-nanoparticle hybrid materials for bioapplications. *Chem Rev*. 2015;115(7):2483–531.
161. Peng L, Xu Z, Liu Z, Wei Y, Sun H, Li Z, et al. An iron-based green approach to 1-h production of single-layer graphene oxide. *Nat Commun*. 2015;6:5716.
162. Ali-Boucetta H, Bitounis D, Raveendran-Nair R, Servant A, Van den Bossche J, Kostarelos K. Purified graphene oxide dispersions lack in vitro cytotoxicity and in vivo pathogenicity. *Adv Healthc Mater*. 2013;2(3):433–41.
163. Dell'Orco D, Lundqvist M, Oslakovic C, Cedervall T, Linse S. Modeling the time evolution of the nanoparticle-protein corona in a body fluid. *PLoS One*. 2010;5(6):e10949-e.
164. Eudald C, Tobias P, Albert D, Gertie Janneke O, Victor P. Time evolution of the nanoparticle protein corona. *ACS Nano*. 2010;4(7):3623–32.
165. Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(6):428–37.
166. Hu W, Peng C, Lv M, Li X, Zhang Y, Chen N, et al. Protein corona-mediated mitigation of cytotoxicity of graphene oxide. *ACS Nano*. 2011;5(5):3693–700.
167. Duan G, Kang SG, Tian X, Garate JA, Zhao L, Ge C, et al. Protein corona mitigates the cytotoxicity of graphene oxide by reducing its physical interaction with cell membrane. *Nanoscale*. 2015;7:15214–24.
168. Cuicui G, Jiangfeng D, Lina Z, Liming W, Ying L, Denghua L, et al. Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(41):16968–73.
169. Li Y, Feng L, Shi X, Wang X, Yang Y, Yang K, et al. Surface coating-dependent cytotoxicity and degradation of graphene derivatives: towards the design of non-toxic, degradable nano-graphene. *Small*. 2014;10(8):1544–54.
170. Gurunathan S, Han J, Park JH, Kim JH. An in vitro evaluation of graphene oxide reduced by *Ganoderma* spp. in human breast cancer cells (MDA-MB-231). *Int J Nanomed*. 2014;9:1783–97.
171. Yuan J, Gao H, Ching CB. Comparative protein profile of human hepatoma HepG2 cells treated with graphene and single-walled carbon nanotubes: an iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS proteome analysis. *Toxicol Lett*. 2011;207(3):213–21.
172. Tomasio SM, Walsh TR. Modeling the binding affinity of peptides for graphitic surfaces. Influences of aromatic content and interfacial shape. *J Phys Chem C*. 2009;113(20):8778–85.
173. Akhavan O, Ghaderi E. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ACS Nano*. 2010;4(10):5731–6.
174. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011;25:287–99.
175. Waiwijit U, Kandhavivorn W, Oonkhanond B, Lomas T, Phokaratkul D, Wisitsoraat A, et al. Cytotoxicity assessment of MDA-MB-231 breast cancer cells on screen-printed graphene-carbon paste substrate. *Colloids Surf B Biointerf*. 2014;113:190–7.
176. Chong Y, Ma Y, Shen H, Tu X, Zhou X, Xu J, et al. The in vitro and in vivo toxicity of graphene quantum dots. *Biomaterials*. 2014;35(19):5041–8.
177. Chen M, Yin J, Liang Y, Yuan S, Wang F, Song M, et al. Oxidative stress and immunotoxicity induced by graphene oxide in zebrafish. *Aqua Toxicol*. 2016;174(1879–1514 (Electronic)):54–60.
178. Meng C, Zhi X, Li C, Li C, Chen Z, Qiu X, et al. Graphene oxides decorated with carnosine as an adjuvant to modulate innate immune and improve adaptive immunity in vivo. *ACS Nano*. 2016;10(1936-086X (Electronic)):2203–13.
179. Ravichandran P, Baluchamy S, Sadanandan B, Gopikrishnan R, Biradar S, Ramesh V, et al. Multiwalled carbon nanotubes activate NF- κ B and AP-1 signaling pathways to induce apoptosis in rat lung epithelial cells. *Apoptosis*. 2010;15(12):1507–16.
180. Lammel T, Boisseaux P, Fernandez-Cruz ML, Navas JM. Internalization and cytotoxicity of graphene oxide and carboxyl graphene nanoplatelets in the human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2. *Part Fibre Toxicol*. 2013;10:27.
181. Gurunathan S, Han JW, Eppakayala V, Kim JH. Green synthesis of graphene and its cytotoxic effects in human breast cancer cells. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:1015–27.
182. Salas EC, Sun Z, Luttge A, Tour JM. Reduction of graphene oxide via bacterial respiration. *ACS Nano*. 2010;4(8):4852–6.
183. Shekaramiz E. Immobilization of mitochondria on graphene. *Dissert Theses Gradworks*. 2012;217(1):120–31.
184. Park EJ, Lee GH, Han BS, Lee BS, Lee S, Cho MH, et al. Toxic response of graphene nanoplatelets in vivo and in vitro. *Arch Toxicol*. 2015;89(9):1557–68.
185. Chatterjee N, Yang J, Choi J. Differential genotoxic and epigenotoxic effects of graphene family nanomaterials (GFNs) in human bronchial epithelial cells. *Mutat Res Gen Tox En*. 2016;798(1879–3592 (Electronic)):1–10.
186. Ivask A, Voelcker NH, Seabrook SA, Hor M, Kirby JK, Fenech M, et al. DNA melting and genotoxicity induced by silver nanoparticles and graphene. *Chem Res Toxicol*. 2015;28(1520–5010 (Electronic)):1023–35.
187. Magdolenova Z, Collins A, Kumar A, Dhawan A, Stone V, Dusinska M. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2014;8(3):233–78.
188. Golbarmaki N, Rasulev B, Cassano A, Marchese Robinson RL, Benfenati E, Leszczynski J, et al. Genotoxicity of metal oxide nanomaterials: review of recent data and discussion of possible mechanisms. *Nanoscale*. 2015;7(6):2154–98.
189. Zhao X. Self-assembly of DNA segments on graphene and carbon nanotube arrays in aqueous solution: A molecular simulation study. *J Phys Chem C*. 2011;115(14):6181–9.
190. Ciccio A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 2010;40(2):179–204.
191. Satoshi F, Macconmara MP, Maung AA, Yan Z, Mannick JA, Lederer JA, et al. Platelet depletion in mice increases mortality after thermal injury. *Blood*. 2006;107(11):4399–406.
192. Chen GY, Yang HJ, Lu CH, Chao YC, Hwang SM, Chen CL, et al. Simultaneous induction of autophagy and toll-like receptor signaling pathways by graphene oxide. *Biomaterials*. 2012;33(27):6559–69.
193. Zhou H, Zhao K, Li W, Yang N, Liu Y, Chen C, et al. The interactions between pristine graphene and macrophages and the production of cytokines/chemokines via TLR- and NF- κ B-related signaling pathways. *Biomaterials*. 2012;33(29):6933–42.
194. Lawrence T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(1943–0264 (Electronic)):a001651.
195. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770–6.
196. Matesanz MC, Vila M, Feito MJ, Linares J, Goncalves G, Vallet-Regi M, et al. The effects of graphene oxide nanosheets localized on F-actin filaments on cell-cycle alterations. *Biomaterials*. 2013;34(5):1562–9.
197. Yao Y, Costa M. Genetic and epigenetic effects of nanoparticles. *J Mol Genet Med*. 2013;7:86.
198. Stern ST, Adisheshaiah PP, Crist RM. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Part Fibre Toxicol*. 2012;9(1743–8977 (Electronic)):1.

199. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cel*. 2010;140(1097–4172 (Electronic)):313–26.
200. Patel AS, Lin L, Geyer A, Haspel JA, An CH, Cao J, et al. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*. 2012;7(1932–6203 (Electronic)):e41394.
201. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. 2011;469(7330):323–35.
202. Kenzaoui BH, Bernasconi CC, Guney-Ayra S, Juillerat-Jeanneret L. Induction of oxidative stress, lysosome activation and autophagy by nanoparticles in human brain-derived endothelial cells. *Biochem J*. 2012;441(1470–8728 (Electronic)):813–21.
203. Hussain S, Garantzios S. Interplay between apoptotic and autophagy pathways after exposure to cerium dioxide nanoparticles in human monocytes. *Autophagy*. 2013;9(1554–8635 (Electronic)):101–3.
204. Sun T, Yan Y, Zhao Y, Guo F, Jiang C. Copper oxide nanoparticles induce autophagic cell death in A549 cells. *PLoS One*. 2012;7(1932–6203 (Electronic)):e43442.
205. Chen GY, Meng CL, Lin KC, Tuan HY, Yang HJ, Chen CL, et al. Graphene oxide as a chemosensitizer: Diverted autophagic flux, enhanced nuclear import, elevated necrosis and improved antitumor effects. *Biomaterials*. 2015;40:12–22.
206. Chen GY, Chen CL, Tuan HY, Yuan PX, Li KC, Yang HJ, et al. Graphene oxide triggers toll-like receptors/autophagy responses in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Adv Healthc Mater*. 2014;3(9):1486–95.
207. Wan B, Wang ZX, Lv QY, Dong PX, Zhao LX, Yang Y, et al. Single-walled carbon nanotubes and graphene oxides induce autophagosome accumulation and lysosome impairment in primarily cultured murine peritoneal macrophages. *Toxicol Lett*. 2013;221(1879–3169 (Electronic)):118–27.
208. Markovic ZM, Ristic BZ, Arskin KM, Klisic DG, Harhaji-Trajkovic LM, Todorovic-Markovic BM, et al. Graphene quantum dots as autophagy-inducing photodynamic agents. *Biomaterials*. 2012;33(29):7084–92.
209. Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SW, Moshiah S, Dorsey F, Connell S, et al. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature*. 2007;450(7173):1253–7.
210. Sasiidharan A, Swaroop S, Chandran P, Nair S, Koyakutty M. Cellular and molecular mechanistic insight into the DNA-damaging potential of few-layer graphene in human primary endothelial cells. *Nanomed*. 2016;12(1549–9642 (Electronic)):1347–55.
211. Yang H, Rivera Z, Jube S, Nasu M, Bertino P, Goparaju C, et al. Programmed necrosis induced by asbestos in human mesothelial cells causes high-mobility group box 1 protein release and resultant inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(1091–6490 (Electronic)):12611–6.
212. Rauti A, Palumbo R, Bianchi ME. HMGB1: a signal of necrosis. *Autoimmunity*. 2007;40(4):285–9.
213. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 2013;14(3):204–20.
214. Fabian MR, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(6):586–93.
215. Nishikura K. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu Rev Biochem*. 2010;79(79):321–49.
216. Dubey P, Matai I, Kumar SU, Sachdev A, Bhushan B, Gopinath P. Perturbation of cellular mechanistic system by silver nanoparticle toxicity: Cytotoxic, genotoxic and epigenetic potentials. *Adv Colloid Interf Sci*. 2015;221:4–21.
217. Collins AR, Ferguson LR. DNA repair as a biomarker. *Mutat Res*. 2012;736(1–2):2–4.
218. Zhao Y, Wu Q, Wang D. An epigenetic signal encoded protection mechanism is activated by graphene oxide to inhibit its induced reproductive toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Biomaterials*. 2016;79(1878–5905 (Electronic)):15–24.
219. Liu C, Yu W, Chen Z, Zhang J, Zhang N. Enhanced gene transfection efficiency in CD13-positive vascular endothelial cells with targeted poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles through caveolae-mediated endocytosis. *J Contr Rel*. 2011;151(1873–4995 (Electronic)):162–75.
220. Ema M, Aoyama H, Arima A, Asano Y, Chihara K, Endoh K, et al. Historical control data on prenatal developmental toxicity studies in rabbits. *Congenit Anom*. 2012;52(3):155–61.
221. Ema M, Endoh K, Fukushima R, Fujii S, Hara H, Hirata-Koizumi M, et al. Historical control data on developmental toxicity studies in rodents. *Congenit Anom*. 2014;54(3):150–61.
222. Bitounis D, Ali-Boucetta H, Hong BH, Min DH, Kostarelos K. Prospects and challenges of graphene in biomedical applications. *Adv Mater*. 2013;25(16):2258–68.
223. Van Goethem F, Lison D, Kirsch-Volders M. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutat Res*. 1997;392(1–2):31–43.
224. Natarajan V, Wilson CL, Hayward SL, Kidambi S. Titanium dioxide nanoparticles trigger loss of function and perturbation of mitochondrial dynamics in primary hepatocytes. *PLoS One*. 2015;10(1932–6203 (Electronic)):e0134541.
225. Hong F, Zhao X, Chen M, Zhou Y, Ze Y, Wang L, et al. TiO₂ nanoparticles-induced apoptosis of primary cultured Sertoli cells of mice. *J Biochem Mater Res A*. 2016;104(1552–4965 (Electronic)):124–35.
226. Yang WE, Lan MY, Lee SW, Chang JK, Huang HH. Primary human nasal epithelial cell response to titanium surface with a nanonetwork structure in nasal implant applications. *Nanoscale Res Lett*. 2015;10(1931–7573 (Print)):1–10.
227. Wang J, Deng X, Zhang F, Chen D, Ding W. ZnO nanoparticle-induced oxidative stress triggers apoptosis by activating JNK signaling pathway in cultured primary astrocytes. *Nanoscale Res Lett*. 2014;9(1931–7573 (Print)):1–12.
228. Osmond-McLeod MJ, Osmond RI, Oytam Y, McCall MJ, Feltis B, Mackay-Sim A, et al. Surface coatings of ZnO nanoparticles mitigate differentially a host of transcriptional, protein and signalling responses in primary human olfactory cells. *Part Fibre Toxicol*. 2013;10(1743–8977 (Electronic)):1.
229. Meng S, Peng R. Growth and follow-up of primary cortical neuron cells on nonfunctionalized graphene nanosheet film. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2016;14(2280–8000 (Electronic)):e26–34.
230. Kwon JT, Seo GB, Jo, Lee M, Kim HM, Shim I, et al. Aluminum nanoparticles induce ERK and p38MAPK activation in rat brain. *Toxicol Res*. 2013;29(1976–8257 (Print)):181–5.
231. Radcliffe PM, Olabisi AO, Wagner DJ, Leavens T, Wong BA, Struve MF, et al. Acute sodium tungstate inhalation is associated with minimal olfactory transport of tungsten (188W) to the rat brain. *Neurotoxicology*. 2009;30(1872–9711 (Electronic)):445–50.
232. Zhang H, Li ZF, Snyder A, Xie J, Stanciu LA. Functionalized graphene oxide for the fabrication of paraoxon biosensors. *Anal Chim Acta*. 2014;827:86–94.
233. Schriver M, Regan W, Gannett WJ, Zaniewski AM, Crommie MF, Zettl A. Graphene as a long-term metal oxidation barrier: worse than nothing. *ACS Nano*. 2013;7(1936-086X (Electronic)):5763–8.
234. Soldano C, Mahmood A, Dujardin E. Production, properties and potential of graphene. *Carbon*. 2010;48(8):2127–50.
235. Han SG, Kim JK, Shin JH, Hwang JH, Lee JS, Kim TG, et al. Pulmonary Responses of Sprague–Dawley Rats in Single Inhalation Exposure to Graphene Oxide Nanomaterials. *Biomed Res Int*. 2015;2015:376756.
236. Pan WY, Huang CC, Lin TT, Hu HY, Lin WC, Li MJ, et al. Synergistic antibacterial effects of localized heat and oxidative stress caused by hydroxyl radicals mediated by graphene/iron oxide-based nanocomposites. *Nanomedicine*. 2016;12(2):431–8.
237. Yang K, Gong H, Shi X, Wan J, Zhang Y, Liu Z. In vivo biodistribution and toxicology of functionalized nano-graphene oxide in mice after oral and intraperitoneal administration. *Biomaterials*. 2013;34(11):2787–95.
238. Jaworski S, Sawosz E, Kutwin M, Wierzbicki M, Hinzmann M, Grodzik M, et al. In vitro and in vivo effects of graphene oxide and reduced graphene oxide on glioblastoma. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:1585–96.
239. Akhavan O, Ghaderi E, Emamy H, Akhavan F. Genotoxicity of graphene nanoribbons in human mesenchymal stem cells. *Carbon*. 2013;54(2):419–31.
240. Chatterjee N, Yang J, Choi J. Differential genotoxic and epigenotoxic effects of graphene family nanomaterials (GFNs) in human bronchial epithelial cells. *Mut Res Gen Tox Environ Mutagenesis*. 2016;798–799:1–10.

Un resumen del artículo Toxicidad de las nanopartículas de la familia del grafeno: una revisión general de los orígenes y mecanismos.

El grafeno se descubrió en 2004. Aislado de los cristales de grafito, está formado por hojas de un átomo de grosor cada una. El óxido de grafeno es uno de los diversos derivados del grafeno y sus características únicas han hecho que se utilice en diversos campos, incluyendo aplicaciones biomédicas como la administración de fármacos. Los datos sobre su toxicidad se basan en una combinación limitada de estudios en animales e in vitro, en los que se han administrado varios derivados del grafeno de diferentes maneras. Esto es importante, ya que el tipo de grafeno y la forma en que entra en el cuerpo -por ejemplo, a través de la inhalación o la inyección subcutánea- influye en el lugar donde acaba en el cuerpo y en su grado de toxicidad. Se necesita más investigación para comprender el impacto del óxido de grafeno administrado por vía subcutánea, como ocurre con las vacunas de ARNm Covid-19.

¿Qué hace que el grafeno sea tóxico?

El grado de toxicidad depende de sus características, desde el tamaño del material hasta su concentración, estructura superficial y carga.

- **Dosis:** las concentraciones más altas de GO tienden a causar más daños: en un estudio, una dosis alta causó toxicidad crónica, con depósitos de GO en los pulmones, el hígado, el bazo y los riñones.
- **Tamaño:** el lugar en el que los nanopartículas de grafeno acaban en el cuerpo y el impacto que tienen depende de su tamaño. Es necesario investigar más sobre este tema.
- **Estructura de la superficie:** Los NGF en general pueden alterar la función y la estructura de las membranas celulares y las proteínas. El OG puede insertarse entre los pares de bases del ADN de doble cadena y perturbar la información genética.
- **Carga:** la carga de la superficie del OG puede hacer que sea absorbido por las células. Se dice que puede alterar la estructura celular y causar una amplia destrucción de los glóbulos rojos.
- **Modificación de la superficie:** los estudios concluyen que la alteración de la superficie de los NGF mediante sustancias como el PEG (un proceso denominado funcionalización) disminuye en gran medida la toxicidad. Sin embargo, dado su elevado potencial de absorción por parte de las células, se necesitan más estudios para evaluar los posibles efectos a largo plazo.
- **Impuros:** el GO preparado tradicionalmente contiene altos niveles de Mn^{2+} y Fe^{2+} , lo que podría provocar niveles inusualmente altos de toxicidad celular y fractura del ADN.
- **Efecto corona de proteínas:** la elevada carga superficial libre del grafeno puede hacer que forme "coronas" con las proteínas del cuerpo. Varios artículos informan de que el OG forma dichas coronas y éstas pueden regular la adhesión del OG a ciertas células e incluso mitigar su toxicidad para las células.

¿Qué efectos tiene en el organismo?

Una vez más, faltan estudios al respecto, pero esto es lo que han demostrado los datos hasta ahora:

Los nanomateriales de grafeno (NGF) pueden penetrar las barreras naturales del cuerpo

Gracias a su pequeño tamaño, los nanomateriales de grafeno -incluido el óxido de grafeno (OG)- pueden atravesar las barreras de protección existentes en el organismo e introducirse en el cerebro, la placenta y, potencialmente, los testículos. En lo que respecta a la placenta, algunos estudios han descubierto que ésta no impide la transferencia de nanopartículas al feto, lo que tiene un impacto significativo en el desarrollo del mismo.

El óxido de grafeno puede dañar los órganos internos

El óxido de grafeno puede causar una inflamación aguda y lesiones en los órganos vitales. En los pulmones, se ha descubierto que causa inflamación, edema pulmonar y la formación de granulomas. Se ha investigado muy poco sobre la toxicidad de los NGF en otros órganos como el hígado, el bazo y los riñones.

Las NGF pueden dañar el sistema nervioso central

Los nanomateriales de grafeno se utilizan cada vez más en neurocirugía, y los estudios se han centrado principalmente en sus aplicaciones más que en su toxicidad. Sin embargo, los estudios muestran que estos materiales pueden disminuir el nivel de ácido ribonucleico y su tasa de síntesis, lo que perjudica el desarrollo de los tejidos cerebrales. Se están realizando más estudios sobre su toxicidad.

El OG daña el sistema de reproducción y desarrollo

Los estudios en animales muestran que el OG y el OG reducido (rGO) dañan a los embriones. Un estudio en ratones descubrió que todas las hembras preñadas a las que se les inyectó rGO sufrieron abortos, independientemente de la dosis. La mayoría de los ratones a los que se les administró una dosis alta murieron, y sus crías sufrieron un retraso en el desarrollo.

El OG destruye la salud de la sangre

Es imposible evitar que el OG entre en la sangre. Su impacto en la sangre depende de su cobertura, tamaño y dosis, pero se ha descubierto que daña los glóbulos rojos y los linfocitos T.

El OG daña y destruye las células

Los nanomateriales de grafeno en general alteran la viabilidad, la forma, el tamaño y la estructura de las células. El OG disminuye específicamente la adhesión celular, lo que puede alterar procesos importantes y provocar enfermedades. También provoca la apoptosis -una forma de muerte celular programada- y entra en los lisosomas, las mitocondrias, el núcleo y el endoplasma de las células. Los derivados del OG disminuyen drásticamente la expresión de los genes diferenciales responsables de la estructura y la función de la membrana celular.

El OG puede desencadenar el cáncer y acelerar el envejecimiento

La interacción del OG con las células provoca un gran estrés oxidativo que puede desencadenar la generación de células cancerígenas y acelerar el envejecimiento. El estrés oxidativo inducido por el OG se ha relacionado con el daño pulmonar agudo, la muerte celular y el daño del ADN.

El OG daña las mitocondrias

Las mitocondrias son los centros energéticos vitales de las células. Los estudios han revelado que la exposición al OG puede reducir el número de mitocondrias en las células paraculares y perjudicar la actividad mitocondrial de tal manera que genera estrés oxidativo y provoca la muerte celular.

El OG daña el ADN

El pequeño tamaño del OG, su elevada superficie y su carga superficial podrían causar graves daños en el ADN. Aunque el OG no pueda entrar en el núcleo de la célula, puede interactuar con el ADN en el momento del ciclo celular en que se rompe la membrana nuclear (mitosis). Esto aumenta el potencial de aberración del ADN. La interacción entre el grafeno y los pares de bases del ADN puede deformar gravemente los pares de bases finales del ADN. El OG también puede causar mutaciones que podrían conducir al desarrollo de cáncer, y si esas mutaciones se producen en las células reproductoras, podrían afectar a la fertilidad y amenazar la salud de la siguiente generación.

El OG desencadena una respuesta inflamatoria y tres tipos diferentes de muerte celular

Los NGF (incluido el OG) pueden provocar respuestas inflamatorias significativas y lesiones en los tejidos. Se ha descubierto que el OG desencadena la apoptosis y la autofagia, ambas formas de muerte celular programada, así como la necrosis, una forma de muerte celular que se produce como resultado de una infección o una lesión.

El OG provoca cambios epigenéticos

Los datos sugieren que los NGF, incluido el OG, podrían modular los cambios epigenéticos que provocan cambios sutiles en la programación de la expresión génica. Sin embargo, esto no se entiende del todo.

La falta de datos

Sencillamente, no hay datos suficientes para comprender plenamente la toxicidad de los NGF en el organismo. Los estudios recientes se han centrado en el impacto a corto plazo, pero se sabe poco sobre los efectos a largo plazo. Por ejemplo, aunque el grafeno funcionalizado parece tener una menor toxicidad, ¿qué ocurre si las capas superficiales que reducen la toxicidad se descomponen con el tiempo? Además, se desconoce si los NGF podrían inducir sarcomas de cuerpo extraño, por lo que se necesitan urgentemente más estudios al respecto.

Documento traducido al español por el equipo de M-Power Translations

Canal de Telegram:

<https://t.me/mpowertranslations>