



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Luis Paulo Bognoni Manzo

**Influência de nanopartículas magnetizadas na sensibilização de
neurônios nociceptivos**

CAMPINAS

(2016)

Luis Paulo Bognoni Manzo

Influência de nanopartículas magnetizadas na sensibilização de neurônios nociceptivos

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de doutor em Biologia Funcional e Molecular na área de concentração de Fisiologia.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO Luis Paulo Bognoni Manzo E
ORIENTADA PELO Prof. Dr. Carlos Amilcar
Parada.

Orientador: Carlos Amilcar Parada

Co-Orientador: Helder Ceragioli

CAMPINAS

(2016)

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 201306211-0

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Gustavo Lebre de Marco - CRB 8/7977

M319I Manzo, Luis Paulo Bognoni, 1981-
Influência de nanopartículas magnetizadas na sensibilização de neurônios
nociceptivos / Luis Paulo Bognoni Manzo. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Carlos Amílcar Parada.

Coorientador: Helder José Ceragioli.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Nociceptores. 2. Magnetismo. 3. Nanopartículas. 4. Neurônios. I.
Parada, Carlos Amílcar. II. Ceragioli, Helder José. III. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The influence of magnetic nanoparticles on the sensitization of
nociceptive neurons

Palavras-chave em inglês:

Nociceptors

Magnetism

Nanoparticles

Neurons

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carlos Amílcar Parada [Orientador]

Anderson Luiz Ferreira

Adair Roberto Soares dos Santos

Diego Muraca

Rickson Coelho Mesquita

Data de defesa: 06-12-2016

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 06/12/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a). Carlos Amilcar Parada
(orientador)

Prof.(a). Dr.(a) Adair Roberto Soares dos Santos

Prof.(a) Dr(a). Anderson Luiz Ferreira

Prof.(a) Dr(a). Diego Muraca

Prof.(a) Dr(a). Rickson Coelho Mesquita

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos os meus professores e colegas de jornada. Desde a primeira letra por mim grafada em caderno de caligrafia até um artigo publicado.

Vocês fizeram e fazem parte de tudo...

Agradecimento

Agradeço aos meus pais por terem me dado a oportunidade de estar em boas escolas, de aprender com bons profissionais e também pelos bons exemplos a mim deixados. Obrigado aos meus amigos e amigas, obrigado à minha companheira diária Verônica pela paciência...e conversa fiada.

Obrigado aos amigos Ivan e Catarine, por tudo, sem vocês dois, obviamente, isto aqui não estaria completo. Obrigado ao, hoje, Professor e amigo Anderson, que desde 2009 me auxilia nesta caminhada profissional. Obrigado a todos os colegas de laboratório (Ju, Amanda, Jalile, Gilson, Will, Kauê, Lilian, Fer, Silviara (as 2), Gal, Maria, André, Fabi, Arthur, Elayne, Claudia, Bianca, Felipe, Filipão, Kiko, Maria Julia, Cesar (es), etc.

Em especial, obrigado ao Professor Parada que me presenteou com este tema, obrigado, também, pelas discussões ricas e as vezes malucas, obrigado pelas mudanças de ideia (sempre de última hora) e, sobretudo, obrigado por me ajudar a compreender, mesmo que pouco, como se fazer ciência!

Prólogo

“Quando o romano Ovídio elaborou Metamorfose, por volta do século 8 da era cristã, MORFEU, o deus dos sonhos, aparece como uma das personagens; quase 1800 anos depois, o farmacólogo alemão Friedrich W.A Saturner utilizou o nome daquela divindade para indicar um analgésico derivado do ópio: a morfina. Essa relação entre o deus e o medicamento não foi meramente fortuita; afinal, um dos mais antigos sonhos humanos é o afastamento ou a ausência de dor” – trecho extraído do livro NÃO ESPERE PELO EPITÁFIO de Mário Sergio Cortella, editora Vozes, 2005.

Resumo

Os campos magnéticos (CM) gerados por aparelhos eletroeletrônicos, como telefones celulares, linhas de transmissão e antenas vêm ganhando importância na vida cotidiana das pessoas. Se por um lado não está claro os efeitos biológicos dos campos magnéticos estáticos, por outro lado, parece não restar dúvidas que campos magnéticos dinâmicos, tal como os produzidos na estimulação magnética transcraniana, promovem efeitos na condutância dos neurônios cerebrais. É bem conhecido que um campo magnético dinâmico influencia a corrente elétrica neuronal. Este efeito tem sido utilizado no controle de doenças neurológicas e psiquiátricas. Segundo a física clássica (Lei de Ampère), a existência de uma corrente elétrica está associada à existência de um campo magnético. Portanto, por definição, o neurônio gera um campo magnético intrínseco, resultado do fluxo de carga que atravessa um canal iônico da membrana da célula, fenômeno já comprovado experimentalmente. Apesar disso, não existem dados sobre a influência do campo magnético neuronal na transmissão do impulso nervoso. De fato, a ideia de que a transmissão neuronal seja um fenômeno puramente elétrico é um paradigma. Dados preliminares de nosso laboratório demonstraram que a administração intratecal de nanopartículas muito magnetizadas, mas não as pouco magnetizadas, diminuíram o limiar nociceptivo mecânico da pata de ratos. Este efeito não foi revertido pela prévia administração sistêmica de anti-inflamatório (dexametasona). Uma vez que a administração intratecal de nanopartículas magnetizadas aumentou a sensibilidade mecânica da pata de ratos quando comparadas à administração de nanopartículas não-magnetizadas e considerando que, teoricamente, as nano partículas magnetizadas teriam efeito apenas em um campo magnético existente, estes resultados sugerem que o campo magnético neuronal talvez tenha um papel na transmissão neuronal. Portanto, o objetivo deste estudo foi tentar demonstrar que a alteração no limiar nociceptivo mecânico induzido pela administração intratecal de nano partículas magnéticas está relacionada à perturbação do campo magnético neuronal.

Abstract

The interference between external magnetic fields and organisms is not new, although, the role of the intrinsic magnetic field (originated by the neuron) remains unclear. This study aimed at investigating whether a probable disturbance of the intrinsic magnetic field would have any role in nociception. Highly and poorly magnetic rGO were injected intrathecally in rats. Electronic Von Frey tests showed that highly magnetic rGO induced more intense hyperalgesia compared with poorly magnetic rGO. Furthermore, the number of KCl (15 mM) responsive DRG-neurons incubated with highly magnetic rGO was greater than the number of responsive cells incubated with poorly magnetic rGO. Capsaicin tests showed that animals injected with highly magnetic rGO were more sensitive to capsaicin comparing to those that received poorly magnetic rGO. The data presented in this study suggest that, somehow, the presence of magnetic nanoparticles in the subarachnoid space of rats disturbs the intrinsic magnetic field, leading to a consequent increase in nociception. This conclusion, by itself, opens an important field of investigation and accredits new and deeper investigations on millenary magnetic therapies used by eastern societies.

Lista de imagens

NUMERO DA IMAGEM	CONTEÚDO
Figura 1	HRTEM e FESEM
Tabela 1	EDS
Tabela 2	Potencial Zeta
Figura 2	Raman e FTIR
Figura 3	Curva de Histerese
Figura 4	Testes comportamentais e cálcio
Figura 5	Resposta induzida Sulfato ferroso
Figura 6	Respostas inflamatórias
Figura 7	MTT
Figura 8	Benidipine
Figura 9	CGS-19755
Figura 10	Citometria de fluxo
Figura 11	Microscopia confocal

Lista de Abreviaturas

rGO – óxido grafeno reduzido

rGO-nm/rGO não mag- óxido grafeno reduzido pouco magnético

rGO-mag – óxido grafeno reduzido muito magnético

NT1- nanotubo de carbono pouco magnético

NT-2- nanofibra de carbono pouco magnética

CEM – campo eletromagnético

CM – campo magnético

i.t – injeção intratecal (espaço sub aracnoide)

i.p – injeção intraperitoneal

Ca_v – canal de cálcio dependente de voltagem

EMT – estimulação magnética transcraniana

PEG – polietilenoglicol

ASIC – canal iônico sensível a acidez

TRPV1 – transiente receptor potential vaniloid 1

BENI – antagonista de canais de cálcio dependentes de voltagem, subtipos L, N e T

CGS – antagonista de receptor NMDA (CGS 19755)

MTT – teste *in vitro* de citotoxicidade

SQUID - *superconducting quantum interference device*

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo principal:

Investigar se o componente magnético do campo eletromagnético neuronal possui papel na transmissão neuronal.

E ainda:

Avaliar os possíveis efeitos da perturbação do campo magnético neuronal, através da administração de nanopartículas magnetizadas e não magnetizadas, na nocicepção.

Avaliar a presença de TNF- α nos sítios de administração das nanopartículas.

Investigar os possíveis efeitos das nanopartículas magnéticas sobre a fisiologia dos canais de cálcio dependentes de voltagem.

Mecanismo de ação envolvendo magnetismo e a resposta nociceptiva.

Sumário

<i>Introdução</i>	<i>16</i>
<i>Materiais e métodos</i>	<i>21</i>
<i>Síntese rGO</i>	<i>22</i>
<i>Caracterização rGO</i>	<i>22</i>
<i>Estrutura rGO</i>	<i>23</i>
<i>Potencial Zeta</i>	<i>23</i>
<i>Raman/FTIR</i>	<i>23</i>
<i>Histerese</i>	<i>24</i>
<i>Animais e grupos experimentais</i>	<i>24</i>
<i>Administração intratecal</i>	<i>25</i>
<i>Testes de von Frey e capsaicina.....</i>	<i>26</i>
<i>Benidipine e CGS 19755</i>	<i>27</i>
<i>Rotarod</i>	<i>27</i>
<i>Cálcio Intracelular</i>	<i>28</i>
<i>Marcação rGO</i>	<i>28</i>
<i>Microscopia confocal</i>	<i>29</i>

<i>Citometria de fluxo</i>	29
<i>MTT</i>	30
<i>Níveis TNF-α</i>	31
<i>Estatística</i>	31
<i>Resultados</i>	32
<i>FESEM e HRTEM</i>	32
<i>EDS</i>	33
<i>Potencial Zeta</i>	33
<i>Raman e FTIR</i>	34
<i>Histerese</i>	35
<i>Resposta Nociceptiva e Cálcio intracelular</i>	36
<i>Resposta Nociceptiva Sulfato Ferroso</i>	36
<i>Resposta inflamatória</i>	39
<i>MTT</i>	41
<i>Benidipine</i>	42
<i>CGS 19755</i>	43
<i>Citometria</i>	44
<i>Microscopia confocal</i>	45
<i>Discussão</i>	46

<i>Conclusão</i>	54
<i>Perspectivas</i>	55
<i>Dados suplementares</i>	56
<i>Referências</i>	57
<i>Apêndices</i>	61

1. Introdução

Com o advento da tecnologia, estamos expostos a diversos novos fatores físicos, químicos e biológicos. Alguns dos efeitos desses novos agentes sobre os organismos ainda não estão muito bem caracterizados e, por vezes, ainda desconhecidos. Os campos eletromagnéticos (CEM), são um bom exemplo de um fator físico a que estamos cotidianamente expostos e ainda não sabemos quais os riscos ou benefícios dessa interação. As ondas eletromagnéticas estão presentes em todo lugar: casa, escritório, indústria, e, sobretudo, perto das redes de transmissão de energia elétrica. Conforme discutido no manual publicado pelo *National Institute of Environmental Health Sciences* em 2002; os potenciais riscos derivados dessa exposição exagerada ainda não foram completamente desvendados. Conforme a intersecção entre o homem e os diversos CEM vem crescendo, a preocupação em entender como essa interação se desenrola também tem recebido maior atenção por parte da comunidade científica. Um dos tipos de CEM que mais chamam a atenção é o campo magnético dinâmico de baixa frequência (30-60 Hz), cuja origem se dá, entre outras, na transmissão da energia elétrica de alta voltagem por fios condutores expostos em torres de transmissão. Estes CEM carregam uma quantidade muito baixa de energia e, portanto, não exercem efeitos térmicos ou ionizantes relevantes, porém pouco se conhece sobre as consequências da superexposição a eles. Alguns estudos já relataram efeitos adversos em animais [1]: mudanças de comportamento [2], interação com a atividade enzimática [3] e síntese e produção de neurohormônios [4]. Além dos efeitos supracitados, destaca-se a associação feita entre doença de Alzheimer e a superexposição a campos magnéticos de alta intensidade [5]. Os estudos acerca dos efeitos biológicos dos campos magnéticos geram discussão e muita curiosidade e parecem, ainda, estar longe do fim. Kay e Venkatraman, em estudos distintos, relataram uma relação entre a alteração do campo magnético da terra e o número de convulsões e internações em hospitais psiquiátricos [6, 7], ademais, foi também relatado que indivíduos mantidos em *bunkers* isolados magneticamente (inclusive do campo geomagnético), tiveram seus ciclos circadianos comprometidos e desordenados e que o mesmo era restabelecido com pequenas exposições a campos magnéticos [8]. Alguns destes efeitos nos ciclos metabólicos podem ser explicados pela suposta influência dos campos magnéticos de baixa frequência sobre a troca iônica nas membranas plasmáticas, sobretudo, na dinâmica dos íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} [9].

É importante lembrar que campos magnéticos dinâmicos induzem correntes elétricas em um sistema onde haja condutância elétrica e não há dúvidas que a corrente elétrica induzida por movimentações iônicas é a base do funcionamento das células excitáveis do organismo, tal como os neurônios. O campo magnético dinâmico, aquele formado, por exemplo, pela alternância dos polos de uma bobina de uma usina hidroelétrica, gerando assim corrente elétrica, difere do campo magnético estático, aquele formado entre dois polos de um ímã. Embora o eletromagnetismo seja uma área da Física que ainda gere muitas dúvidas quando comparada à eletricidade, não nos atemos ao detalhamento físico e matemático das propriedades eletromagnéticas neste trabalho.

Baseada nas propriedades do campo magnético dinâmico, a estimulação magnética transcraniana (EMT) tem sido usada como ferramenta no tratamento e diagnóstico de doenças neurológicas e distúrbios psiquiátricos. A EMT foi introduzida por Barker em 1985 [10] e desde então vêm ganhando importância por ser um método relativamente barato, simples e mecanicamente não invasivo. A EMT tem sido utilizada no diagnóstico e tratamento de epilepsia [11] e Parkinson e estudos têm sido realizados para validar o seu uso no tratamento de depressão [12]. Embora estes estudos deixem claro que um campo magnético externo pode modular a atividade neuronal, isso não permite concluir que os campos magnéticos formados pela própria transmissão neuronal (Lei de Ampère e base teórica deste trabalho) possuem alguma implicação neurofisiológica, mesmo porque, como descrito anteriormente, por definição, um campo magnético dinâmico altera as propriedades elétricas do neurônio. Cabe ressaltar que a vantagem da aplicação de um campo magnético para modular as propriedades elétricas do neurônio é, sobretudo, o fato deste interagir com a resposta neuronal e induzir seu efeito proporcionalmente à atividade do neurônio, o que não aconteceria se fosse aplicado diretamente um estímulo elétrico.

Contudo, os mecanismos biológicos pelo qual a EMT influencia a atividade neuronal ainda não estão inteiramente compreendidos. Tem sido sugerido que muitos dos efeitos já descritos, senão todos, seriam decorrentes de perturbações nos níveis de cálcio intracelular, provavelmente por modulação da atividade dos canais de cálcio dependentes de voltagem encontrados nas sinapses neuronais [13]. Estes canais de cálcio parecem ser mais sensíveis às alterações induzidas por estimulações magnéticas de baixa frequência [13]. Estes dados sugerem a extrema importância de se compreender melhor este tipo de interação. O cálcio é o mensageiro secundário mais comum do sistema nervoso. Algumas poucas funções neuronais não envolvem o cálcio, direta ou indiretamente, portanto, a regulação e controle dos

níveis intra e extracelulares de cálcio são de fundamental importância para a homeostasia do sistema nervoso. Os canais de cálcio, portanto, são imprescindíveis para o correto funcionamento celular e qualquer modificação sobre eles geram consequências fisiológicas, tais como alterações na expressão gênica e sinapses [14].

De acordo com as propriedades eletromagnéticas, estes campos magnéticos externos ao organismo poderiam influenciar o campo elétrico neuronal, embora a variação do potencial de membrana gere uma corrente elétrica (iônica) e consequentemente um campo eletromagnético. Segundo a Lei de Ampère, quando uma corrente elétrica (movimento de cargas elétricas) percorre um fio condutor, um campo eletromagnético (B) é formado em uma determinada região do espaço a uma certa distância (r). O campo magnético pode ser definido pela expressão: $B = \frac{\mu \cdot i}{2\pi r}$, na qual μ é a permeabilidade no vácuo, i é a corrente elétrica (ou iônica). Podemos extrapolar essa equação para um neurônio: quando ocorre um fluxo iônico por um determinado canal, por definição, um campo eletromagnético é gerado ao redor do próprio canal. Conceitualmente, o impulso nervoso pode ser interpretado através de equações matemáticas e mensurado por técnicas de eletrofisiologia [15, 16]. Durante muito tempo, considerou-se que o impulso nervoso seria composto por um fluxo de íons através de uma célula nervosa, semelhantemente ao que ocorre em um condutor metálico (fio, por exemplo). No entanto, as propriedades elétricas dos neurônios apresentam-se distintas daquelas verificadas em fios metálicos, de maneira que a condução nervosa ocorre de forma mais lenta e sem mudanças de magnitude. Esta corrente elétrica neuronal é resultado da alteração entre as cargas elétricas intra e extra-celulares, denominada de potencial de ação [17]. Esta ideia de um campo magnético sendo gerado a partir da transmissão elétrica neuronal não é nova, e foi, inclusive, comprovada experimentalmente em 1980 por Wikswo e colaboradores [15]. Nervo ciático de sapo (*Rana Catesbiana*) foi coletado e imerso em solução fisiológica aerada, solução de “Ringer” e então estimulado eletricamente na porção proximal enquanto um eletrodo captava o potencial de ação em sua porção distal ou vice-versa. Este experimento, há quase 3 décadas, permitiu a mensuração e a comprovação da existência do campo magnético gerado a partir de um único neurônio. Este registro utilizou o *superconducting quantum interference device (SQUID)*, o qual detecta mudanças no fluxo magnético. Para um único neurônio, um campo magnético de intensidade de 70 pT e duração de 1 ms foi registrado [15].

Desde o início do século 18, cientistas vêm estudando a natureza elétrica da propagação do impulso nervoso. Algumas técnicas derivaram deste interesse científico, como

por exemplo o eletrocardiograma, a eletromiografia e o eletroencefalograma. Ao contrário, o estudo da natureza magnética da transmissão neuronal é dificultado pela falta de recursos técnicos, e, portanto, não é tão difundido, porém, as técnicas de magnetocardiograma e magnetoencefalograma propiciaram o “casamento” entre o conhecimento teórico da física clássica e os fenômenos biológicos. Nos últimos anos, apenas uma técnica que mensurasse a natureza magnética da propagação de um impulso nervoso foi descrita: a sonda de corrente neuromagnética (neuromagnetic current probe) [15, 18], por outro lado, o interesse nos efeitos causados no organismo pelo magnetismo tem crescido enormemente, sobretudo, devido aos efeitos observados. Foi descrito que campos magnéticos de baixa frequência influenciam a abertura de canais iônicos (K^+ , Na^+ e Ca^+) [9], a exposição aguda a campos magnéticos de baixa frequência diminuíram o efeito analgésico de opióides [19]. Animais expostos a campos magnéticos de baixa frequência apresentaram alterações no ritmo diurno do limiar de dor por interferência no sistema associado com o ciclo claro-escuro do ambiente [20], outro estudo demonstrou que a exposição de camundongos aos campos magnéticos de baixa frequência induziu hiperalgesia térmica [21].

Hoje, existem técnicas já bastante difundidas para o diagnóstico e tratamento de doenças do sistema nervoso, uma delas é a estimulação magnética transcraniana, porém, é importante ressaltar que esta técnica permite apenas inferir a respeito do campo magnético gerado por uma fonte magnética externa ao neurônio (uma bobina é posicionada próxima ao cérebro do paciente). O campo eletromagnético, que aqui chamamos de “intrínseco”, e que é originado a partir do próprio neurônio, ainda permanece na sombra. Muito pouco se questionou ou se estudou a respeito de sua importância, funcionamento ou efeitos, embora, teoricamente, ele possa ter uma influência na transmissão neuronal.

Os “nano-ímãs”

Com o surgimento da nanotecnologia, que utiliza recursos disponíveis da engenharia para a manipulação de átomos e moléculas com a finalidade de formar novos produtos com dimensões nanométricas (10^{-9} m), tornou-se possível a obtenção de materiais em escalas nanométricas (nanomateriais).

Um dos mais promissores nanomateriais é o óxido grafeno reduzido (rGO), importante devido às suas propriedades químicas, físicas, eletrônicas, ópticas, térmicas e mecânicas únicas [22]. Devido a essas características, os grafenos são largamente utilizados em diversos ramos de atividade: tecnologia de energia, nano-eletrônica, sensores e também

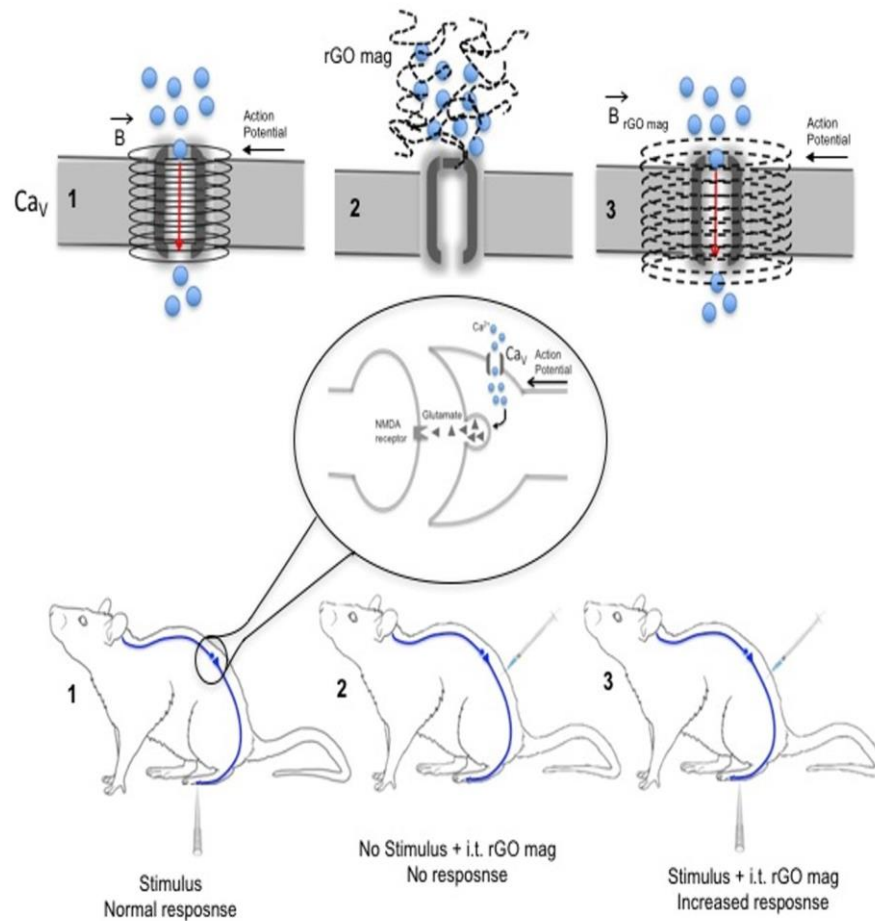
em pesquisas biomédicas [23]. O desenvolvimento de grafenos, sobretudo, aqueles com propriedades ferromagnéticas nos inspirou a pensar numa maneira de se tentar investigar um possível papel do campo magnético “intrínseco” na condução do estímulo nervoso: A administração de nanopartículas ferromagnéticas (nano-ímãs) no espaço subaracnoide de ratos (administração intratecal – i.t) acarretaria algum efeito sobre o limiar mecânico de retirada da pata de ratos? A mesma resposta seria observada para materiais menos magnéticos? O magnetismo intrínseco do material interferiria com o campo magnético intrínseco e geraria alguma resposta?

Recentemente, em nosso laboratório, observamos que nanotubos magnéticos administrados no espaço subaracnoide (i.t) da medula espinal de ratos induziam uma alteração significativa no limiar mecânico nociceptivo de ratos. Este mesmo efeito não foi observado quando nanofibras não magnéticas eram administradas nas mesmas condições experimentais. Estes resultados, embora preliminares, sugeriam que o campo magnético neuronal intrínseco podia, de alguma forma, ser perturbado pelo comportamento magnético das nanopartículas e, portanto, exercer alguma influência na transmissão do impulso nervoso. É importante ressaltar que, por definição e considerando as leis que regem o eletromagnetismo, a presença destes “nano-ímãs” no meio extracelular de uma fibra nervosa apenas influenciaria a corrente elétrica por meio de uma interferência em um campo magnético existente, ou seja, se a corrente elétrica (ou campo elétrico) neuronal se formasse independentemente do campo magnético, estas nanopartículas provavelmente não teriam nenhuma interferência no comportamento dos ratos.

Embora não se possa descartar qualquer influência biológica dos nanotubos não relacionadas às suas propriedades magnéticas apenas, sugerimos que estes resultados credenciam estudos mais apurados, dada a importância científica acerca do papel do campo magnético na transmissão do impulso nervoso e, também, aos inúmeros questionamentos relacionados a este tema.

2. Materiais e Métodos:

2.1. Esquema teórico



2.2. Síntese do Óxido Grafeno Reduzido

Todas as nanopartículas utilizadas neste estudo foram sintetizadas e caracterizadas no laboratório do Professor Victor Baranauskas pelo pesquisador Helder Ceragioli da Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação da UNICAMP (FEEC).

O óxido de Grafeno reduzido foi preparado a partir de uma conversão catalítica, utilizando um substrato de cobre recoberto com uma solução de 1ml de polianilina diluída em dimetilformamida e posteriormente deixado para secar em temperatura ambiente por duas horas. Sobre o substrato com polianilina foi colocada uma solução de catalisador para o crescimento dos rGO de 0,2 ml de nitrato de níquel diluída em acetona para o rGO-nm e solução de sulfato ferroso 0,2 mL para rGO-mag. O substrato de cobre foi imerso em um reator de deposição química a partir da fase vapor assistido por um filamento quente (HFCVD), sendo o reator alimentado por uma fonte de carbono formado pela mistura de cânfora, acetona e ácido cítrico. Esta mistura foi borbulhada por hidrogênio e o vapor arrastado para o interior do reator. A pressão no interior do reator foi de 20 Torr, com um filamento de tungstênio à uma temperatura de 2000°C. A formação de ambos óxidos grafeno reduzidos se deu pelo choque do vapor arrastado para o interior do reator com o filamento quente, onde os radicais de carbono formados foram depositados sobre o substrato de cobre, formando, assim, os óxidos grafenos reduzidos **pouco magnéticos**, aqui descritos como rGO-não mag e **muito magnéticos**, aqui descritos como rGO-mag.

2.3. Caracterização dos óxidos grafenos reduzidos (rGO-não mag e rGO-mag)

2.3.1. Estrutura do rGO e análise química quantitativa – (HRTEM, FESEM e EDS)

Para as determinações morfológicas, químicas, utilizou-se a microscopia eletrônica de Varredura por emissão de campo (FESEM) e Microscopia eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (HRTEM) para ambos rGO. Para imagens de HRTEM, uma gota de suspensão de rGO em acetona (melhora a dispersão dos rGO) foi depositada em uma grade pequena de cobre (3 mm de diâmetro). Os microscópios utilizados foram: FESEM - Inspect F50 - FEI, operado em 20 kV. Durante a obtenção das imagens pelo FESEM, utilizamos o modulo EDS, que é um raio-x de baixa profundidade para a obtenção das quantidades relativas de cada elemento químico da amostra. A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada utilizando-se o microscópio HRTEM-JEOL 3010, operado em 300KV com filamento Lab₆.

2.3.2. Medidas de tamanho e potencial zeta dos óxidos grafenos reduzidos (rGO)

A técnica de Dynamic Light Scattering (DLS) foi usada para medir o diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersividade dos óxidos grafenos reduzidos com o equipamento ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire/UK), a 25 °C, ângulo de 90 °, usando-se tubos de poliestireno com 10 mm. O potencial zeta foi medido com o mesmo instrumento e capilar de mesmo tamanho (10 mm). A solução contendo os grafenos (1 mg/mL) foi diluída (1:100) em 1 mL de água ultrapura. Os resultados foram expressos como as médias de 3 diferentes medidas e na unidade de mV. As medidas de diâmetro não fazem sentido para grafenos, uma vez que não possuem diâmetros constantes e, portanto, foram desprezadas.

2.3.3. Ligações químicas nos rGO - FTIR e Espectroscopia Raman

As medidas de FTIR foram feitas pelo modulo ATR, utilizando-se o equipamento Bruker – Vertex - 70V. As amostras de rGO, em pó, foram colocadas em um pequeno quadrado de diamante e uma pequena prensa de forma pontiaguda com ponta de germânio. Colocou-se as amostras de rGO sobre a grade utilizando-se espátula de aço e aplicou-se uma pressão, então a leitura foi realizada.

Os espectros de Raman foram realizados com as amostras de rGO em pó e lidos em temperatura ambiente, empregando-se um equipamento da Renishaw microRaman com laser argon, excitação ($\lambda = 514.5$ nm) e potência de aproximadamente 6mW.

2.3.4. Avaliação das Propriedades Magnéticas de Nanopartículas de Carbono

Para a avaliação das propriedades magnéticas utilizamos um magnetômetro SQUID (Superconducting Quantum Interference Device), modelo MPMS-5 (“Magnetic Properties Measurements System”) de 5T (tesla) de campo máximo. As medidas foram realizadas no laboratório de Materiais e Dispositivos do Instituto de Física Gleb Wataghin

(IFGW) da UNICAMP do Prof. Dr. Iakov Kopelevitch, pelo pós-doutorando Robson Ricardo da Silva. Este equipamento fornece a curva de magnetização em função do campo magnético aplicado (ciclo de histerese magnética).

Em uma temperatura de 310 K, mediu-se o momento magnético para diferentes valores de campo induzido, começando em zero até um certo valor máximo ($B_{\text{máx}}$), em intervalos pré-estabelecidos. Diminuiu-se, então, o campo até ($-B_{\text{máx}}$) e, posteriormente, aumentou-se até $B_{\text{máx}}$, formando-se assim um ciclo de histerese (este ciclo completo é chamado de *loop* de histerese).

2.4. Animais e Grupos experimentais

Ratos machos Unib: WH com 7 a 8 semanas de idade, pesando entre 220 e 250 gramas, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Unicamp (CEMIB) foram utilizados para todos os experimentos. Os animais foram mantidos sob condições controladas de luz (ciclo de 12 horas de claro/escuro) e temperatura (21°C). Os animais foram separados aleatoriamente nos grupos de estudo.

Os procedimentos de manipulação experimental dos animais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo “Comitê de Ética para o Uso de Animais de Experimentação” (CEUA) do Instituto de Biologia da Unicamp, sob o número de protocolo 29861.

Os animais foram separados, a priori, em 3 grupos:

PEG – animais que receberam administração i.t. apenas o veículo das nanopartículas

rGO-não mag – animais que receberam administração i.t. de rGO-não mag.

rGO-mag – animais que receberam administração i.t. de rGO-mag.

A dinâmica experimental se deu de acordo com o esquema abaixo:



V.F = von Frey Eletrônico

i.t = injeção intratecal

2.5. Administração intratecal (i.t.)

O método de administração intratecal direta descrita por Papir-Kricheli e colegas em 1987 foi ligeiramente modificado, de acordo com trabalho publicado por Mestre e colaboradores, 1994 [24]. Após tricotomia dorsal na altura das cristas ilíacas, os animais foram anestesiados, por via inalatória, induzida por isoflurano (Forane, Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.) e posicionados em decúbito ventral sobre um cilindro, para que sua região lombar ficasse hiperfletida. Em seguida, uma agulha para insulina BD *Ultra-Fine® 30U* (29G) contendo as nanopartículas rGO ou veículo (polietilenoglicol, (Quemis Indústria Química do Brasil Ltda)) foi inserida no espaço subaracnoide, entre as vértebras L4-L5 (± 1) em ângulo de aproximadamente 45° , e o volume de 20 μl injetado. A correta localização da punção no espaço subaracnoide pode ser verificada pela observação de um reflexo na cauda do animal (*flinch* caudal).

2.6. Estimulação nociceptiva mecânica e química.

Estes testes foram realizados para estudarmos a sensibilização dos neurônios nociceptivos após a administração de nanopartículas magnetizadas e não-magnetizadas.

O uso de Von Frey eletrônico é um método utilizado para avaliar hipernocicepção. Esse método foi adaptado para um equipamento eletrônico usado inicialmente em humanos [25] e posteriormente adaptado para ratos [26]. No presente trabalho, os experimentos foram realizados com um analgesímetro eletrônico (EFF 301 Analgesímetro Digital, Insight, Brasil), que consiste em um transdutor de força conectado a um contador digital que expressa força em gramas (g). Os animais foram colocados em caixas, cujo assoalho consiste de uma rede de malha igual a 5 mm² de arame não maleável de 1 mm de espessura. Os ratos permaneceram nas caixas durante 15 minutos para habituação antes do início do teste comportamental.

É aplicada, por entre as malhas da rede, uma força linearmente crescente no centro da superfície plantar da pata do rato até que o animal retire a pata estimulada produzindo uma resposta caracterizada como sacudida (“*flinch*”). Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, em geral, até que o animal apresente 3 medidas consecutivas similares com uma clara resposta de “*flinch*” após a retirada da pata.

O limiar mecânico de retirada da pata, expresso em gramas (grama-força), é medido no tempo 0 ou também chamado basal (antes da administração das nanopartículas ou veículo) e 30 minutos após a administração.

Para a estimulação química da resposta nociceptiva comportamental com capsaicina, os animais foram colocados em uma caixa de madeira com espelho em 3 faces e fechada por vidro na face anterior, propiciando uma visão completa do animal. Capsaicina intraplantar (0,5 µg/pata) foi injetada na área central da pata traseira e o número de *flinches*, comportamento estereotipado de dor em ratos, foi contado e registrado por 5 minutos, imediatamente após a injeção.

2.7. Antagonistas (CGS 19755 e Benidipine)

CGS 19755 (TOCRIS, USA), antagonista dos receptores de NMDA foram administrados intratecalmente em uma dose de 1 nM em 20 μ L de solução por rato, 5 minutos após a administração das nanopartículas magnéticas e não magnéticas, como descrito na seção “administração nanopartículas”, acima.

O Benidipine (TOCRIS, USA), antagonista de canais de cálcio dependentes de voltagem (L, N e T) foi administrado via intratecal antes da administração das nanopartículas e utilizando-se o mesmo material e a mesma técnica descrita para as mesmas. Dose de 300ng em 20 μ L de volume total por animal.

2.8. Teste de capacidade motora – Rotarod

Este teste foi realizado para verificarmos a influência das nanopartículas magnetizadas na capacidade motora de ratos. O aparato consiste basicamente de 4 barras giratórias separadas por 5 paredes permitindo que sejam testados 4 ratos simultaneamente. As barras giram em torno de um ângulo fixo a uma velocidade constante. Abaixo de cada uma das barras encontra-se uma plataforma que desligará o contador no momento em que o animal cair sobre a mesma. O procedimento será realizado de acordo com o modelo descrito por Tsuda et al. (1996). Os ratos foram colocados na barra giratória e o tempo de permanência medido. Os animais passaram por esse treino imediatamente após a medição por Von Frey (aproximadamente 30 minutos após a administração das nanopartículas).

2.9. Influência das nanopartículas magnéticas na cinética do cálcio intracelular em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal.

Esta análise por fluorescência da cinética da concentração relativa de cálcio intracelular foi realizada para verificar uma possível influência das nanopartículas magnetizadas e não magnetizadas nos canais de cálcio dos neurônios do gânglio da raiz dorsal. As células neuronais foram incubadas em solução de Hanks contendo 5 mM de Fluo4-AM (Invitrogen) e 1% de powerload (Invitrogen) por 30 minutos. Após este período, uma câmara de perfusão (Warner Instruments) foi inserida na placa de cultura contendo as células. Este conjunto foi, então, colocado em um microscópio invertido (Leica DMI6000) equipado com iluminação para epi-fluorescência (excitação 480nm, supressão 527/30nm) e uma câmera digital para captura de imagens. As culturas de células foram perfundidas com solução de Hanks em diferentes molaridades de KCl; 5 mM, 15 mM e 50 mM respectivamente, sendo o fluxo de perfusão de 3 ml/minuto (ocorrendo uma troca completa da câmara de perfusão a cada 3 segundos). Imagens foram adquiridas a cada 1 segundo e os dados compostos pelo número de células responsivas ao Hanks 15 mM de KCl em relação ao total de células viáveis e responsivas ao Hanks 50 mM de KCl em três situações distintas: quando as células foram incubadas com DMEM+rGO-nm ou DMEM+rGO-mag por aproximadamente 30 minutos ou quando incubadas apenas com veículo (DMEM).

2.10. Marcação do grafeno (rGO-mag) com o corante PKH26

Para a marcação dos grafenos rGO-mag e rGO-nm, foi utilizado o kit para coloração PKH26PCL (Sigma Aldrich, USA), [27]. O kit contém o corante PKH26, que é um corante vermelho fluorescente, atóxico e hidrofóbico, e o Diluent C, que é um diluente específico para essa marcação. Os rGO foram primeiramente diluídos em Diluent C, que é específico para esta marcação, e posteriormente o corante PKH26 foi acrescentado. Os

grafenos, juntamente com o fluoróforo, foram incubados em temperatura ambiente por 5 minutos e em seguida centrifugados a 31.000 rpm durante 3 horas a 4°C. Após a centrifugação, os rGO-PKH26 foram lavados com PBS e centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm para retirada do excesso de corante e ressuspensos em PBS para a posterior utilização.

2.11. *Internalização do grafeno (rGO-mag) pelas células do DRG*

Células do DRG foram cultivadas em microplacas de cultura de 24 poços na concentração de 1×10^6 células/ml, na temperatura de 37°C, em estufa com sistema de CO₂ a uma concentração constante de 5%. Posteriormente, foram adicionados aos poços 10 µg/mL de NT-PKH26 e incubados em estufa com sistema de CO₂ a temperatura de 37°C. A análise da internalização foi realizada por dois métodos: microscopia confocal e citometria de fluxo.

2.12. *Microscopia confocal*

Para preparação das lâminas, as células foram incubadas sobre lamínulas de vidro juntamente com os grafenos corados. Após as 24 horas de incubação, as lamínulas foram então fixadas com paraformaldeído 4% e lavadas com PBS. Para montagem, utilizou-se o corante nuclear TOPRO na diluição 1:100. As lâminas foram examinadas no microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta, no mesmo dia da montagem. O laser Argon 488-nm foi usado para a excitação do corante PKH26.

2.13. *Citometria de fluxo*

Células do DRG foram cultivadas em microplacas de cultura de 24 poços na concentração de 1×10^6 células/ml, na temperatura de 37°C, em estufa com sistema de CO₂ a uma concentração constante de 5%. Posteriormente, foram adicionados aos poços 50 µg/mL de NT-PKH26 e incubados em estufa com sistema de CO₂ a temperatura de 37°C. A análise da internalização foi realizada por dois métodos: microscopia confocal e citometria de fluxo.

2.14. *Citotoxicidade por MTT*

Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pelo rGO no metabolismo celular de glicídeos, usualmente através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT para formazan. Dessa forma, a redução do MTT para formazan, será diretamente proporcional à viabilidade celular.

Células do gânglio da raiz dorsal (DRG) foram incubadas em placas de cultura de 96 poços em uma densidade de aproximadamente (5×10^4 células) por 24 horas. Após este período, as células foram tratadas com os grafenos (rGO-mag e rGO-nm – utilizando-se uma concentração dez vezes maior do que a utilizada nos testes *in vivo*) e com o controle DMEM e deixadas na estufa (37°C e 5% CO₂) por 3 horas. Após as 3 horas, o meio de cultura foi retirado de todos os poços e lavados 2 vezes com 200 µl de PBS estéril (37°C), garantindo a lavagem e consequente retirada completa dos grafenos. Em seguida, 100µl da solução de MTT (0,5mg/mL) foi adicionada e as células incubadas por 2 horas. Após o período de reação, o MTT foi retirado e 100 100µl de DMSO puro foi adicionado. Após estes procedimentos, a placa foi levada ao leitor de ELISA configurado para leitura em 540 nM.

Os cálculos foram realizados calculando-se a média de absorbância de todos os testes e subtraindo-se o valor dos brancos. O valor obtido pela subtração da média dos controles pela média dos brancos foi considerado como 100% de células viáveis.

2.15. *Nível de TNF- α na medula espinal*

Uma hora após a administração intratecal de ambos rGO, a medula espinal foi coletada e imediatamente colocada em nitrogênio líquido e posteriormente transferida para um ultrafreezer de -80°C. O tempo de coleta foi definido por ser o tempo relativo ao pico de hiperalgesia induzido pelos rGO. Todas as amostras foram pesadas e colocadas em tubos de 2 mL com tampão apropriado para homogeneização. O homogeneizador de tecidos “Fast Prep” (MP Biologicals, USA) foi utilizado para a completa homogeneização dos tecidos. Os níveis de TNF- α foram medidos pelo kit Duoset (R&D, USA) seguindo os passos descritos pelo fabricante. Os resultados foram expressos em picogramas por grama de tecido (pg/g).

2.16. *Análise Estatística*

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa *GraphPadPrism 5.0* e os resultados foram representados como a média $\pm$ erro padrão da média em grupos de 5 a 10 ratos. As diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas utilizando-se a análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) e duas vias (*two-way* ANOVA). Em seguida, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Tukey e Bonferroni para se obter comparações pareadas. O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

3. Resultados

3.2. Caracterização físico-química e magnética de rGO-mag e rGO-não mag

3.2.1. Microscopia eletrônica de Varredura e Transmissão (FESEM e HRTEM)

A caracterização físico-química e magnética das nanopartículas utilizadas neste estudo é de suma importância pois a ideia principal do trabalho reside na premissa que a única diferença existente entre rGO-mag e rGO-não mag seja o magnetismo e não suas propriedades físico-químicas. Para verificarmos a morfologia dos rGO, FESEM e HRTEM foram realizadas, como demonstrado na figura 1, painéis A, B, C, D e E.

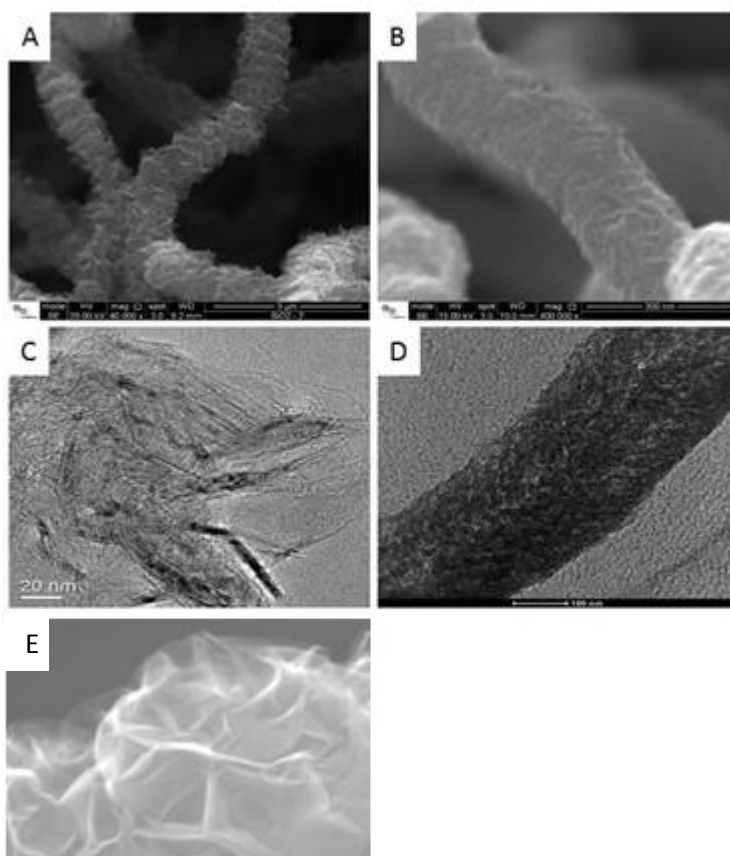


Figura 1: Os painéis A e B mostram, respectivamente, a estrutura externa em folhas (“*nanosheets*”) dos grafenos rGO-não mag e rGO-mag pela microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FESEM). Os painéis C e D mostram, respectivamente, a ultraestrutura das folhas “*nanosheets*” dos rGO pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM). O painel E representa a ultraestrutura das folhas de rGO.

3.2.2. Composição química elementar dos rGO - *Energy-dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS)*

Para a determinação dos elementos químicos presentes em ambos rGO, utilizou-se a microscopia de transmissão em modos de imagem de campo aberto direto e também em *high-angle annular dark field*. O EDS foi realizado com uma *nanoprobe* de 1 mm de diâmetro. O espectro foi determinado em comprimento de 1-1,5 micrometro de comprimento, como mostrado na tabela 1.

Elemento	C	S	Fe	W	O	Ni	Cu	total
rGO-mag	98,9	0,02	0,56	0,47	-	-	-	100%
rGO-não mag	96,04	-	-	-	3,6	0,06	0,3	100%

Tabela 1: Composição química de rGO-mag e rGO-não mag obtida por EDS.

3.2.3. Determinação da carga de superfície das nanopartículas (*zeta potential*)

O conhecimento da carga de superfície de um material é de extrema importância para a determinação de seu comportamento em uma dada dispersão. A interface entre o material e o meio possui cargas elétricas que podem acarretar instabilidade (agregação e floculação) ou estabilidade (mantendo o material “livre”, sem grânulos). Estes valores são

dados pela análise de potencial zeta. A tabela 2 mostra os valores do potencial zeta de cada um dos grafenos utilizados, rGO-não mag e rGO-mag.

AMOSTRA	POLIDISPERSIVIDADE	POTENCIAL ZETA (Mv)
rGO-não mag	0,535	-7,79± 0,36
rGO-mag	0,431	-10,7 ±0,40

Tabela 2: Medida do diâmetro médio de rGO não mag e rGO-mag em solução completa de Hanks. Índice de polidispersividade de rGO-não mag e rGO-mag em solução completa de Hanks. Indicação da média dos 3 valores do potencial zeta para rGO-não mag e rGO-mag em mV. O rGO-não mag possui carga de superfície de - 7,79 mV e o rGO-mag possui carga de superfície de -10,7 mV, o que determina instabilidade na solução medida (Hanks).

3.2.4. Espectroscopia Raman e espectroscopia Raman com transformada de Fourier

Para se demonstrar quais tipos de ligação químicas estão presentes em cada uma das amostras, a espectroscopia Raman e a espectroscopia de Raman com transformada de Fourier do óxido grafeno reduzido pouco magnético (rGO-não mag) e do óxido grafeno reduzido muito magnético (rGO-mag) foram realizadas, como demonstrado pela figura 2.

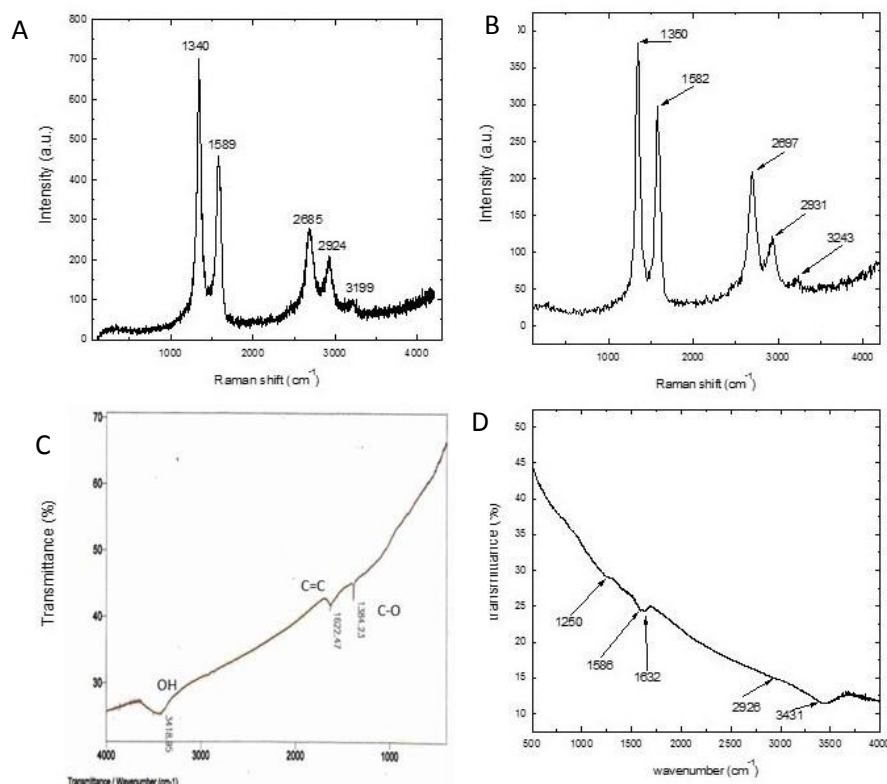


Figura 2- Espectroscopia Raman e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) de rGO-nm (A, C) e rGO-mag (B, D). Para ambas as amostras (rGO-não mag e rGO-mag) foram observados picos nas regiões de banda atribuídas às nanopartículas de carbono (1350cm^{-1} e 1590cm^{-1}). Os gráficos de transmitância (FTIR), figuras C e D mostram, respectivamente, a ligação C=C de vibração de grupos aromáticos do oxido de grafeno reduzido (rGO), baixa concentração de oxigenio em 1384 cm^{-1} de C-O, vibração de grupo epoxy e C-O, vibração de grupo Alkoxy e a vibração e deformação de O-H (3418 cm^{-1}). A figura D demonstra regiões de banda atribuídas às ligações C-C (grupo fenil) ($1577/89\text{cm}^{-1}$) e ligações C=C ($1622/\text{cm}^{-1}$) e C=O (grupo uracil) ($1632/4\text{cm}^{-1}$).

3.2.5. Avaliação das propriedades magnéticas (Curvas / Ciclos de Histerese)

Após a demonstração da similaridade química e morfológica entre rGO-mag e rGO-nm, decidimos comparar o comportamento magnético de cada um dos grafenos utilizados. A figura 3 representa a curva de histerese das nanopartículas rGO-não mag e rGO-mag, evidenciando suas propriedades magnéticas em diferentes intensidades de campo magnético induzido.

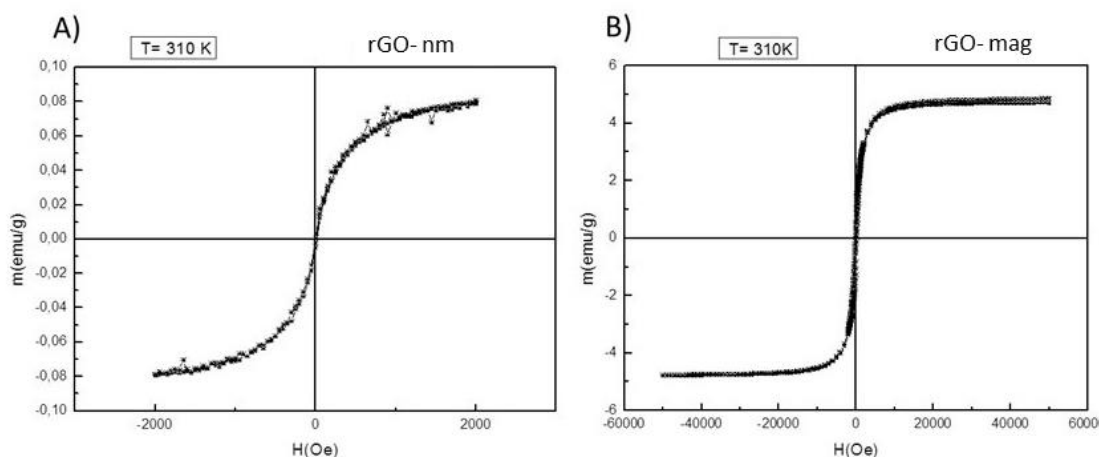


Figura 3 (A e B): ciclo de histerese dos grafenos testados (rGO-não mag e rGO-mag). A quantidade de massa magnetizada por grama de material em um determinado campo magnético induzido é aproximadamente 35 vezes maior para o rGO-mag em relação ao rGO-não mag. Por se tratar de um ciclo, os valores negativos devem ser interpretados em módulo. A temperatura foi estabelecida em 310 K (temperatura ambiente).

3.3. Resposta nociceptiva comportamental induzida por estímulo mecânico ou químico em ratos tratados com rGO-mag ou rGO-não mag

Como mostrado na figura 4, painel A, a administração intratecal de rGO-mag induziu uma resposta nociceptiva maior se comparada com rGO-não mag, tanto frente ao estímulo mecânico (figura 4, A) quanto químico (figura 4, C). O limiar mecânico de retirada da pata (figura 5) foi medido usando-se o teste de von Frey eletrônico (Δ = valores 1 hora após a injeção intratecal subtraído dos valores basais). Após os testes iniciais, avaliamos ainda se a quantidade de nanopartícula administrada interferiria com a resposta observada. A figura 4, painel B, representa a diminuição do limiar mecânico de retirada da pata dos ratos administrados com 4 concentrações diferentes de rGO-mag (0,001; 0,1; 0,5 e 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). PEG utilizado como veículo para todas as concentrações testadas.

A resposta nociceptiva induzida por estímulo químico (capsaicina intraplantar) foi avaliada pelo número de *flinches* de pata (comportamento de dor estereotipado) observados num intervalo de 5 minutos, imediatamente após a administração de capsaicina, conforme mostrado na figura 4, painel C.

3.4. Efeito da incubação com rGO-mag ou rGO-não mag na dinâmica do Ca^{2+} intracelular em culturas de células do DRG:

Também foi investigado se as nanopartículas magnetizadas aumentam a excitabilidade de neurônios do DRG mantidos em cultura. Como demonstrado na figura 4, painel D, o número de neurônios que responderam ao estímulo de KCl (15 mM) foi maior quando as células foram pré-incubadas com rGO-mag comparando com células pré-incubadas com rGO-não mag.

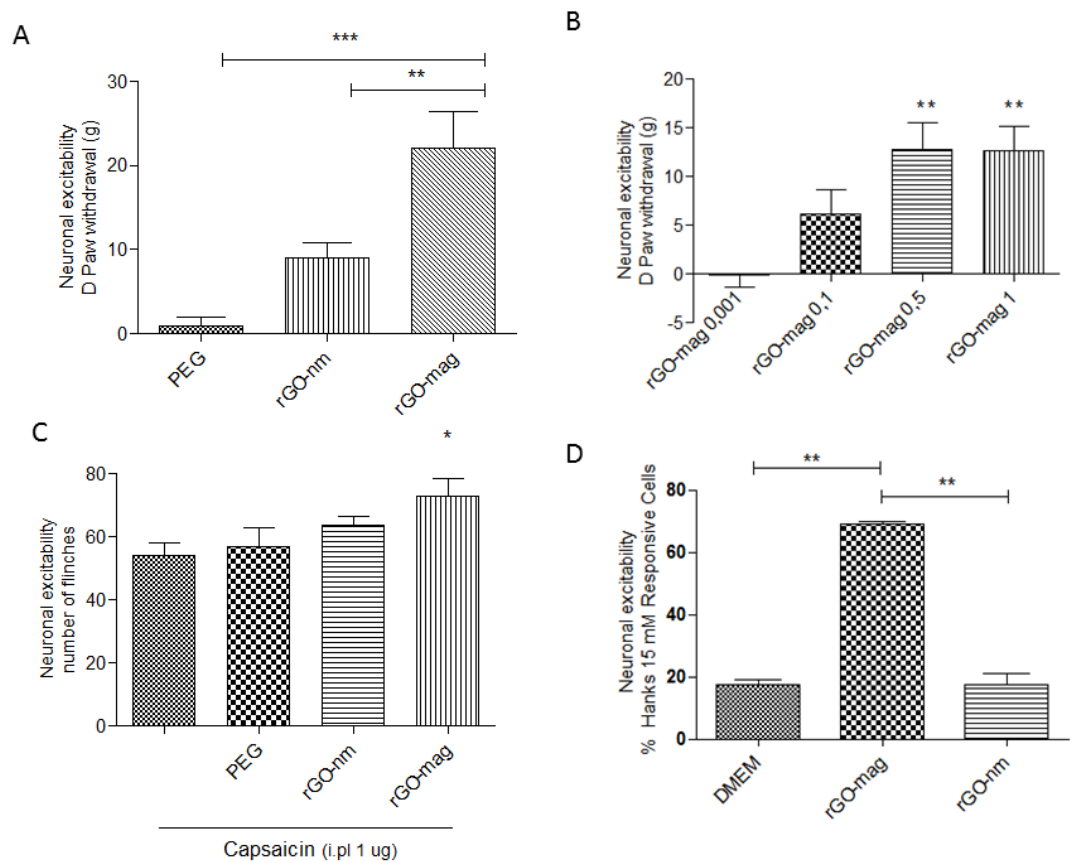


Figura 4: A administração de rGO-mag induziu maior aumento de resposta nociceptiva em relação a administração de rGO-nm. Painel B representa as respostas para diferentes concentrações de rGO-mag. As concentrações de 0,5 e 1 µg/µL induziram maior efeito que 0,001µg/µL. As concentrações de 0,5 e 1 µg/µL mostraram mesma eficiência (n=5animais/grupo). Painel C demonstra o número de *flinches* de pata de ratos que receberam rGO-mag antes do estímulo intraplantar de 0,5 µg/pata de capsaicina. Os ratos que foram pré-tratados com rGO-mag (i.t) apresentaram maior número de *flinches* de pata em relação aos animais que receberam rGO-não mag ou PEG antes da capsaicina (n=5animais/grupo). O painel D apresenta a porcentagem de células responsivas ao estímulo de Hanks (15mM de K) quando pré-incubadas (30 min) com rGO-mag (72%), rGO-não

mag (21 %) e apenas DMEM (18 %). O número total de células por grupo foi de aproximadamente 120 e o tempo de exposição ao KCl foi de 30 segundos. Oneway ANOVA e teste *post hoc* de Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

3.5. Resposta nociceptiva comportamental induzida por estímulo químico em ratos tratados com $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$:

Como demonstrado anteriormente, a morfologia e a composição química do rGO-mag e rGO-não mag são essencialmente as mesmas, porém, como mostrado na tabela 1, rGO-mag possui eventuais traços de Fe e S, oriundos do $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$, catalisador utilizado para sua síntese. O catalizador Ni é utilizado na síntese de rGO-não mag, por isso é possível detectar uma pequena porcentagem em sua composição (tabela 1). Para avaliarmos se a resposta nociceptiva induzida por rGO-mag seria oriunda da pequena quantidade de ferro presente em rGO-mag, $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ foi administrado por via intratecal nos ratos e a excitabilidade neuronal foi testada pelo von Frey eletrônico, como mostrado na figura 5.

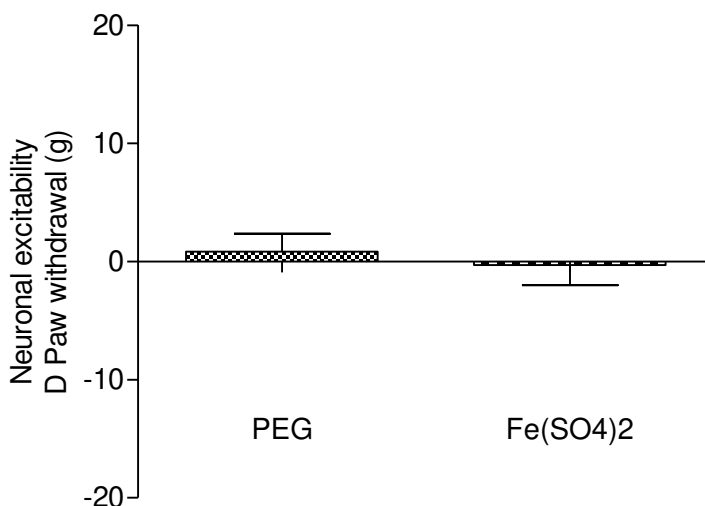


Figura 5: Teste do limiar mecânico de retirada da pata de ratos injetados (i.t) com 20 μL de veículo (PEG) e sulfato ferroso ($\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$). Não houve diferença entre os grupos veículo e sulfato ferroso. N=5 animais/ grupo. Teste t, * $p < 0,05$.

3.6. Administração de rGO-mag ou rGO-não mag não induzem resposta inflamatória:

O aumento da excitabilidade neuronal por estímulo nociceptivo pode ser consequência de processos inflamatórios na região subaracnóide e consequente liberação de mediadores inflamatórios que sensibilizam os nociceptores. Portanto, foi averiguado se a administração de rGO-mag poderia aumentar a excitabilidade neuronal em decorrência liberação de mediadores inflamatórios. Para isso, ratos foram pré-tratados com dexametasona sistêmica (i.p) uma hora antes da administração intratecal (i.t) de rGO-mag e o limiar nociceptivo mecânico foi medido, conforme indicado na figura 6, painel A. A figura 6, painel B, representa os níveis da citocina pró-inflamatória, TNF- α , medida 1 hora após administração de rGO-mag ou rGO-não mag. Os painéis C e D representam os níveis de TNF- α produzidos (lizado celular) e liberados (sobrenadante) por células incubadas com rGO-mag + DMEM ou rGO-não mag + DMEM por 3 horas, respectivamente:

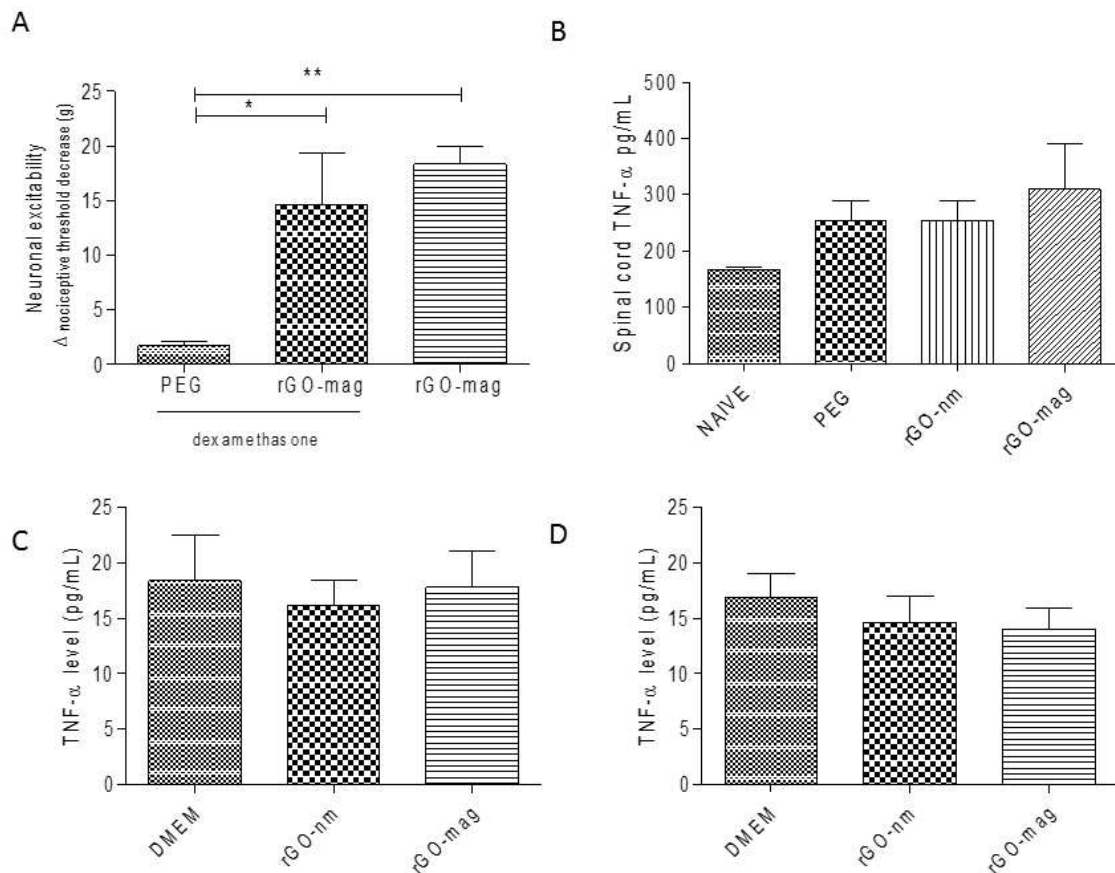


Figura 6: A pré administração de dexametasona (1 mg/Kg/ml) não impediu o aumento da resposta nociceptiva induzida por rGO-mag, painel A (n=5 animais/ grupo). O painel B mostra os níveis de TNF- α 1 hora após a administração (i.t) de rGO-não mag e rGO-mag (n=3 animais/ grupo). Os níveis de TNF- α na medula de animais que receberam rGO-não mag e rGO-mag não se elevaram em relação aos animais controle (naïve). Os painéis C e D demonstram, respectivamente, os níveis de TNF- α produzidos e liberados (citossólico e sobrenadante) por células do DRG incubadas por 3 horas com rGO-mag e rGO-não mag (n=3 placas/grupo). Oneway ANOVA e teste *post hoc* de Bonferroni (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

3.7. Administração de rGO-mag ou rGO-não mag não induzem morte celular – teste de MTT:

Para se comprovar que a administração de rGO-mag ou rGO-não mag não induz toxicidade às células do GRD, decidimos realizar o ensaio de MTT. Os testes foram realizados em células do DRG de ratos em cultura. A figura 7 mostra que a incubação por 3 horas com rGO-mag ou rGO-não mag não induziu morte celular em células do DRG de ratos.

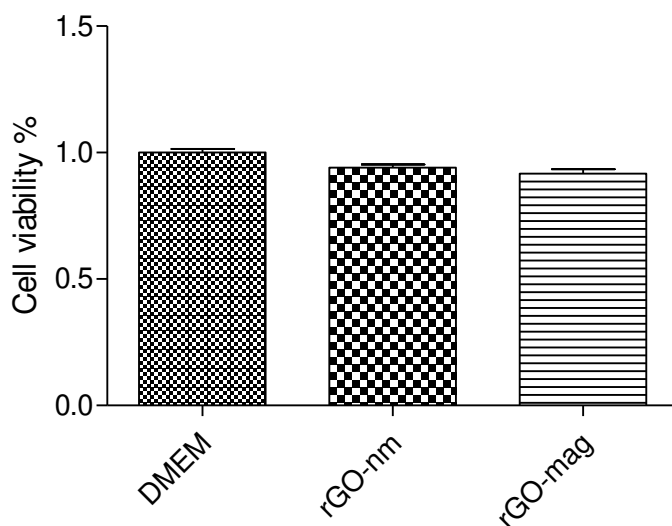


Figura 7: Células do DRG incubadas por 3 horas com rGO-não mag e rGO-mag (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) não induziram morte celular quando comparadas às células não incubadas (DMEM). Oneway ANOVA, e teste *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0.05$.

3.8. Efeito da administração intratecal de Benedipine, um antagonista de canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca^{2+}_v) subtipos L, N e T em ratos tratados com rGO-mag:

Tem sido sugerido que os canais de cálcio sofram influência de campos magnéticos estáticos e dinâmicos, portanto, averiguamos se o bloqueio dos Ca^{2+}_v , subtipos L, N e T, na medula dos ratos afeta a excitabilidade neuronal induzida pela administração intratecal de rGO-mag. A figura 8 representa o limiar nociceptivo mecânico de ratos tratados com rGO-mag e pré-tratados Benedipine (300 ng):

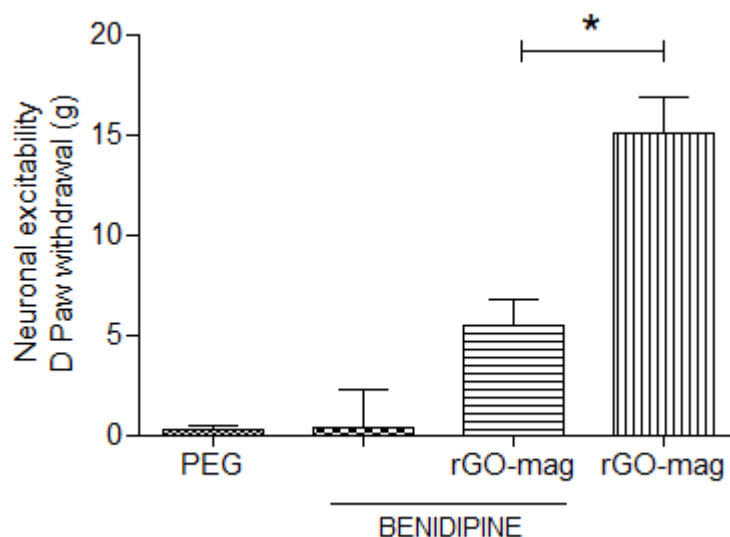


Figura 8: A administração (i.t) do bloqueador de canais de cálcio dependentes de voltagem L, N e T (Benidipine 300 ng). O aumento da resposta nociceptiva é eficazmente diminuído após a administração de benidipine em relação ao grupo rGO-mag e não apresenta diferença significativa em relação ao grupo controle PEG (n= 5 animais/grupo). Oneway ANOVA, teste *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$.

3.9. Efeito da administração intratecal do antagonista seletivo de receptor NMDA (CGS 19755) em ratos tratados com rGO-mag:

Como o resultado anterior sugere que o aumento da excitabilidade neuronal induzida pela administração de rGO-mag envolve um aumento da atividade sináptica de neurônios nociceptivos com consequente aumento da liberação de glutamato na medula espinal, verificamos se os receptores de NMDA estariam envolvidos no aumento desta resposta nociceptiva. CGS 19755 (1 ng/20 μ L) foi injetado por via intratecal 5 minutos antes da administração de rGO-mag ou rGO-não mag. Como mostrado na figura 9, a administração de CGS 19755 aboliu completamente a diminuição do limiar nocieptivo mecânico, 30 minutos após a administração intratecal de rGO-mag.

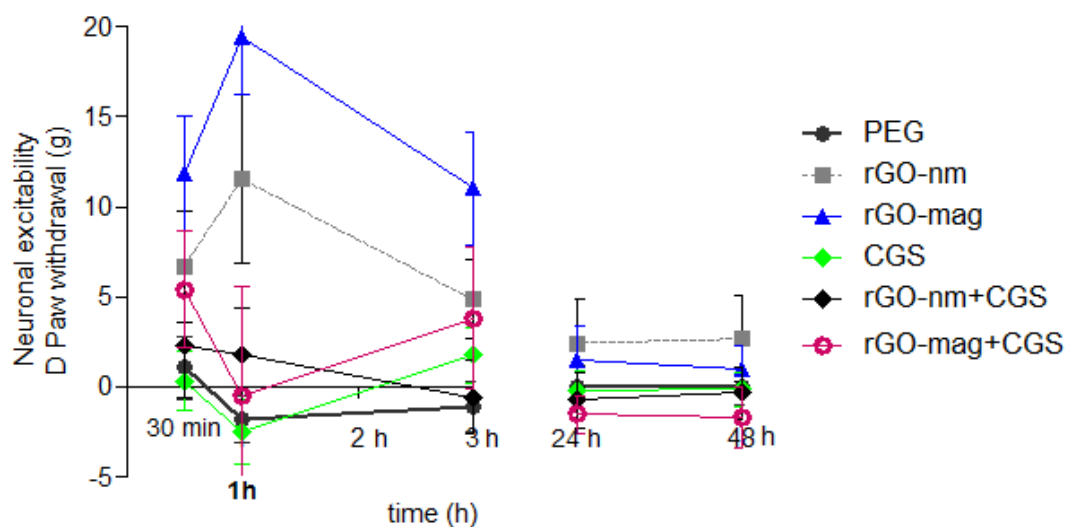


Figura 9: A administração de CGS 19755 (1 ng – i.t), um antagonista de receptor NMDA, foi capaz de prevenir completamente, de forma dependente do tempo, o aumento da resposta nociceptiva induzida pela administração de rGO-mag. A administração de CGS 19755, sozinha, não alterou o limiar mecânico de retirada da pata basal dos ratos (n=5 animais/ grupo). Two-way ANOVA. * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

3.10. *Internalização do rGO por células do DRG (citometria de fluxo e microscopia confocal):*

3.10.1. *Avaliação do tamanho e granulosidade (Citometria de fluxo)*

De acordo com os resultados mostrados anteriormente, o aumento da excitabilidade neuronal induzido pela administração de rGO-mag é de curta duração. Além das características físicas dos rGO, existem relatos de células do DRG internalizando rGO. Decidimos, portanto, avaliar a granulosidade de células do DRG mantidas em cultura por 24 horas e incubadas com rGO-mag. A figura 10 mostra a citometria de fluxo comparando células incubadas com rGO-mag (B) por 24 horas e células controles, incubadas apenas com meio DMEM (A) em relação ao tamanho e granulosidade. O mesmo resultado é apresentado na forma de histograma, onde se encontra expresso o número total de células no pico maior (62,9% para DRG e 48,6% para as DRG+rGo-mag. O deslocamento do gráfico para a direita expressa a complexidade e granulosidade (SSC) das células do DRG. O histograma da figura B mostra que o número absoluto de células que apresentam granulosidade aumentou de 22,8% para 38,5%, sugerindo a internalização do rGo-mag pelas células da DRG.

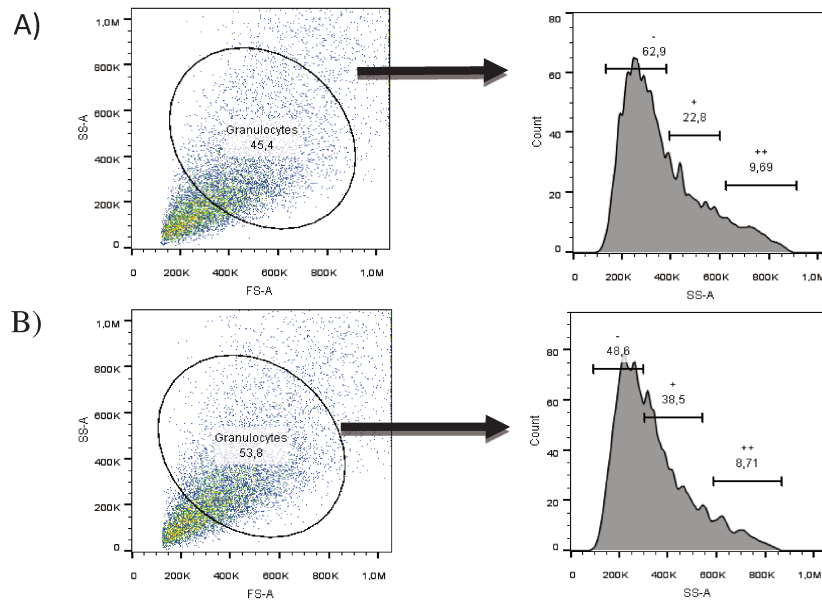


Figura 10: Citometria de fluxo demonstrando a porcentagem de células incubadas com rGo-mag (B) por 24 horas e células incubadas com DMEM (A) em relação ao tamanho e granulosidade. A figura B demonstra aumento na granulosidade das células viáveis do DRG (52,6%) que foram incubadas com rGO-mag, quando comparada às células incubadas com DMEN (45,4%). O mesmo é apresentado em histograma, expressando o número total de células no pico maior (62,9% para DRG e 48,6% para as DRG+rGo-mag).

3.10.2. Avaliação da internalização (microscopia confocal)

A figura 11, painel A, representa o núcleo de diferentes tipos celulares corados com corante TOPRO (azul) (A). O painel B mostra rGO-mag corado com PKH-26 (vermelho) e o painel C mostra a sobreposição das imagens A e B, evidenciando a presença de rGO-mag dentro de diferentes tipos celulares em cultura de células de DRG (gânglio da raiz dorsal) após 24 horas de incubação com rGO-mag.

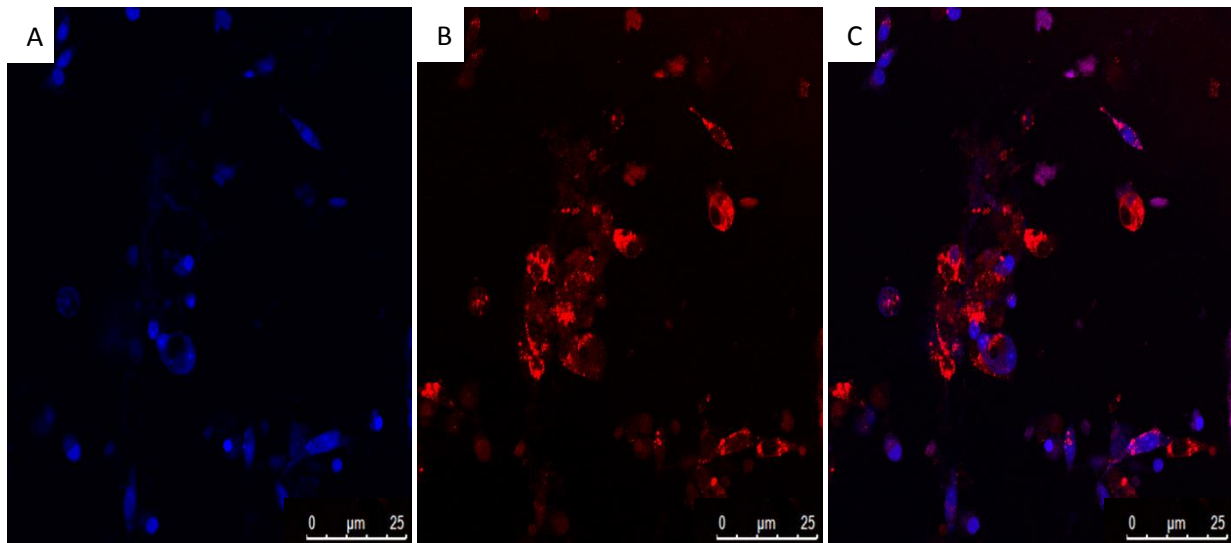


Figura 11: imagem de diferentes células do DRG internalizadas com rGO-mag (vermelho) após 24 horas de incubação com rGO-mag. Os núcleos aparecem corados em AZUL. Emissão em 555 nm e excitação em 543 nm.

4. Discussão

Por definição os neurônios estimulados produzem um campo eletromagnético. Embora modulações magnéticas e aplicação de campos magnéticos dinâmicos no Sistema Nervoso central tenham sido usadas com fins terapêuticos, nada se conhece sobre um possível papel fisiológico do componente magnético do campo eletromagnético neuronal na sua excitabilidade. Neste estudo, foram realizadas estratégias experimentais que pudessem indicar ou sugerir alguma função do campo magnético neuronal (campo magnético “intrínseco”) na condução das fibras nervosas.

De fato, existem raríssimos trabalhos na literatura voltados a estudarem o campo magnético neuronal, pois trata-se de um campo eletromagnético de baixíssima intensidade quando comparado com o campo elétrico [31]. Porém, é importante salientar que este fato não descarta sua importância no sistema nervoso.

Os resultados obtidos neste estudo deixam claro que interferências no componente magnético do campo eletromagnético neuronal aumenta a excitabilidade dos neurônios nociceptivos da medula espinal. Embora os mecanismos iônicos desta constatação não foi possível ser melhor elucidado neste estudo, é sabido que quando ocorre um movimento de carga (íons) em uma determinada direção, de acordo com a primeira Lei de Ampère, gera-se, ao redor desse fluxo de carga, um campo magnético, cuja intensidade varia de acordo com a quantidade de carga em movimento [32]. A existência deste campo magnético é, por definição, um fenômeno físico concreto e já foi mensurado em axônio isolado de neurônio periférico de sapo, cuja intensidade é de aproximadamente de 70 pT [18].

A transmissão de qualquer informação pelo sistema nervoso acontece devido a alterações elétricas na membrana dos neurônios, gerada a partir uma diferença de potencial (ddp) entre o meio intra e extra-celular chamada de potencial de membrana. A geração de estímulos (neste caso, nociceptivo) ocorre em função da mudança de concentração de cargas elétricas intra e extracelulares nos nociceptores (terminações livres), evento este que pode gerar um potencial de ação, em outras palavras, gerar um impulso elétrico que percorre a membrana do neurônio. É proposto ainda que as cargas iônicas, tais como Na^+ ou K^+ se movimentando por difusão dentro dos neurônios são os responsáveis pela abertura de canais iônicos subsequentes, que se abrem em função de alterações no Campo Elétrico (canais

iônicos dependentes de voltagem). Esses canais iônicos são fundamentais para a geração de potenciais de ação e consequentemente, para a condução do estímulo elétrico [33-35].

Embora, teoricamente, um campo magnético extrínseco (ou externo ao neurônio) possa alterar o campo elétrico intrínseco (gerado pelo próprio neurônio) e consequentemente modular a abertura de canais iônicos dependentes de voltagem (por exemplo, nas Estimulação Magnética Transcraniana), não existe dado que sugira algum papel fisiológico do Campo Magnético formado pela movimentação iônica na membrana neuronal estimulada, chamado neste trabalho de Campo Magnético Neuronal ou “Intrínseco”. Como a transmissão do impulso elétrico envolve o movimento de cargas (íons) por canais iônicos e este movimento necessariamente origina um campo magnético, este estudo tenta investigar se a presença das nanopartículas magnéticas na medula espinal de ratos causaria alguma influência na excitabilidade neuronal sugerindo assim um papel do componente magnético do campo eletromagnético formado pelo neurônio na transmissão neuronal.

As análises físico-químicas realizadas nas nanopartículas utilizadas neste estudo deixam claro que as rGO-mag e as rGO-não mag se tratam de nanopartículas com as mesmas estruturas, e mesmas propriedades físico-químicas [33]. As imagens de microscopia eletrônica de varredura e transmissão mostram a similaridade estrutural entre o rGO-não mag e rGO-mag, ambas formando estruturas denominadas de “*nanosheets*”. A espessura de cada folha de rGO utilizado foi medida, bem como seus respectivos diâmetros. Cabe ressaltar que a medida do diâmetro não faz sentido para estruturas que não formam tubos perfeitos, como ocorre com os rGO utilizados por nós e por esse motivo, seus valores foram desconsiderados.

Uma alteração da excitabilidade neuronal pode ser observada indiretamente pela alteração do limiar nociceptivo mecânico, pois necessariamente um aumento ou diminuição da excitabilidade neuronal leva a uma diminuição ou aumento, respectivamente, do limiar nociceptivo mecânico da pata de ratos, por exemplo. Da mesma maneira pode-se concluir que um aumento da excitabilidade neuronal acarreta um aumento da resposta nociceptiva frente a um estímulo químico aplicado, por exemplo, na pata de ratos. Portanto, a diminuição do limiar mecânico de retirada da pata de ratos frente a estímulos mecânicos (teste de Von Frey eletrônico) ou o aumento de “flinches” decorrentes da administração de capsaicina intraplantar em ratos tratados com administração de nanopartículas magnéticas (“nano-imãs”) no espaço subaracnóide demonstra que uma interferência no campo magnético neuronal altera a excitabilidade do neurônio.

É importante lembrar que as nanopartículas tratadas com óxido ferroso, aqui denominadas de nanopartículas magnetizadas, na verdade se tornam magnéticas quando submetidas a um campo magnético e, portanto, não se encontram no estado magnetizadas por si próprias, tal como ímãs. Sendo assim, as nanopartículas magnetizadas (rGO mag) amplificam o campo magnético existente. Este fato difere essencialmente dos campos magnéticos dinâmicos externos, tais como as estimulações magnéticas transcranianas (TME). É possível que esta seja a razão pela qual a grande maioria dos estudos clínicos e experimentais demonstram que as TME induzem efeito inibitório, ao contrário do efeito descrito neste estudo após uma interferência no campo magnético neuronal intrínseco.

Um fato interessante observado neste estudo é que as nanopartículas magnéticas interferem na excitabilidade neuronal mediante um estímulo mas aparentemente não estimulam os neurônios, uma vez que não foi observado comportamentos tipicamente nociceptivos espontâneos dos ratos após a administração intratecal de rGO-mag mesmo após a recuperação do estado de anestesia.

É importante esclarecer que excitabilidade e estimulação não são sinônimos e, na realidade se tratam de fenômenos distintos embora interdependentes. Excitabilidade pode ser explicada pela capacidade de um neurônio responder a um estímulo. A resposta de um neurônio frente um estímulo depende do grau de excitabilidade deste neurônio que quanto maior for maior será sua resposta. À luz dos fenômenos eletrofisiológicos, um aumento da excitabilidade de um neurônio implica no aumento do número de potenciais de ação emitidos por este neurônio frente a um estímulo. À luz das respostas comportamentais, um aumento da excitabilidade neuronal implica em uma diminuição do limiar de resposta deste neurônio ou em um aumento da resposta comportamental, no caso deste estudo, em uma diminuição do limiar nociceptivo mecânico ou no aumento do comportamento nociceptivo (número de “flinches”). Está bem esclarecido que a sensibilização dos neurônios nociceptivos reflete no aumento da excitabilidade neuronal.

A forma mais comum de sensibilização dos neurônios periféricos nociceptivos, ou neurônios nociceptivos primários ou nociceptores (todos sinônimos) são os processos inflamatórios. Portanto este estudo teve uma preocupação fundamental em excluir qualquer possibilidade do aumento da excitabilidade neuronal induzida pela administração de rGO-mag estar relacionada com algum processo inflamatório induzido por estas nanopartículas. De fato, seria muito pouco provável que a administração de rGO-mag no espaço subaracnóide

induzisse uma resposta inflamatória, uma vez que não foi observado nenhuma alteração no limiar nociceptivo ou na resposta nociceptiva induzida por carragenina nos ratos tratados com rGO-não mag, a qual possui a mesma estrutura molecular e as mesmas características físico-químicas que as rGO-mag.

Os dados deste trabalho descartam de maneira categórica a influência de uma resposta inflamatória no aumento da excitabilidade neuronal observada pela administração de nanopartículas magnéticas no espaço subaracnóide. De fato, não foi constatada alteração dos níveis de TNF-alfa na medula espinal após a administração de rGO-mag. Também não foi observada a prevenção do aumento da excitabilidade neuronal induzido pelas rGO-mag em ratos pré-tratados com dexametasona. É importante esclarecer que o tempo de administração de dexametasona usado neste estudo (1 hora antes do estímulo) foi o mesmo usado em estudos prévios que demonstram a forte atividade anti-inflamatória da dexametasona em prevenir o desenvolvimento da hiperalgesia (sensibilização) inflamatória em uma dose que impede a sensibilização inflamatória sem alterar o limiar basal dos animais [38]. Nossos resultados *in vitro* mostraram também que células do DRG incubadas por 3 horas com rGO-mag e rGO- não mag não apresentaram qualquer diferença significativa nos níveis de TNF- α liberado ou produzido quando comparados às células não incubadas com rGO, corroborando a hipótese de que os efeitos observados são fruto da interação magnética e não do desenvolvimento de inflamação.

Um aumento da excitabilidade neuronal, seja ele por processo inflamatório ou não, normalmente acarreta em um aumento da liberação de glutamato nas sinapses da medula espinal [31, 39, 40], que consequentemente ativa os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA nos neurônios nociceptivos de segunda ordem. Este fenômeno de sensibilização dos neurônios de segunda ordem da medula espinal pode ser também observado experimentalmente pela administração de glutamato ou NMDA na medula espinal. Da mesma forma, antagonistas de receptores de NMDA revertem a sensibilização induzida por processos inflamatórios ou pela administração intratecal de glutamato. A relação entre aumento da excitabilidade neuronal e liberação de glutamato depende também de um aumento do influxo de cálcio no neurônio primário que vai, por sua vez, promover a liberação de glutamato na fenda pré-sináptica [41]. A alteração no influxo de cálcio no neurônio pré-sináptico modula diretamente as sinapses [42, 43]. O influxo de cálcio no neurônio nociceptivo primário ocorre pela abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem, os quais, teoricamente estariam mais susceptíveis às alterações no campo magnético neuronal, conforme demonstrado em

nosso ensaio de influxo de cálcio em células do DRG. Outros trabalhos também sugerem a interação entre magnetismo e canais de cálcio [21, 44, 45], entretanto, os efeitos observados após exposições a campos magnéticos são controversos na medida em que a frequência, a intensidade, a duração da exposição e até mesmo a espécie animal estudada parecem exercer um papel fundamental na indução do efeito [21] e, acima de tudo, esses estudos tratam de um campo magnético externo ao neurônio, algo fundamentalmente diferente de nosso foco de investigação. Importante salientar que estes subtipos de canais de cálcio estão presentes no DRG e também no corno dorsal da medula espinal [46] e estão envolvidos na via nociceptiva. Bloqueadores dos subtipos N, inclusive, já estão liberados para o tratamento de dores crônicas [47], ou seja, estão envolvidos nas vias de nocicepção. A possível modulação dos canais de cálcio dependentes de voltagem causada pela interferência no campo magnético neuronal causada pela presença das nanopartículas magnéticas rGO-mag poderia interferir nas sinapses, direta ou indiretamente. Sabe-se também que existem vários outros subtipos de canais de cálcio dependentes de voltagem e até outros canais iônicos seletivos a outros íons [48] e que, portanto, a administração de Benidipine não é responsável por estes bloqueios, o que fortalece nossa hipótese, já que houve uma atenuação da diminuição de limiar e não sua total anulação.

Os dados deste estudo demonstraram que tanto o bloqueio dos receptores de glutamato, tipo NMDA quanto da atividade dos canais de cálcio Cav2+ preveniram o aumento da excitabilidade neuronal induzida pela administração intratecal de rGO-mag. Estes dados sugerem que a amplificação do campo magnético neuronal afeta de maneira positiva a dinâmica das sinapses na medula espinal. Isto, contudo, não descarta uma alteração não menos positiva nos outros canais iônicos neuronais, sobretudo aqueles encontrados ao longo das fibras neuronais como os canais de Na⁺ e K⁺ dependentes de voltagem. Contudo, os protocolos experimentais plausíveis de serem realizados neste estudo não permitem observar tal influência, a qual deverá ser objeto de estudos futuros pelo nosso grupo.

Outro dado interessante observado neste estudo foi a brevidade do efeito na medula espinal. Como descrito nos resultados, a administração de rGO-mag aumentou a excitabilidade neuronal por um período de 4 horas aproximadamente, sendo que após 24 horas, os ratos retornaram à normalidade, sem nenhum sinal de alteração neuronal. É plausível hipotetizar que as nanopartículas magnéticas interajam com o campo magnético neuronal apenas enquanto estão dispersas no meio extracelular, portanto, as cargas de superfície dos rGO em solução são de extrema importância para este estudo pois interferem

diretamente na estabilidade da dispersão (formação de grânulos). Neste estudo, trabalhamos com o melhor dispersante para ambos rGO. Comparamos a dispersão dos rGO em água destilada, PEG 4000 (diluído em álcool), Pluronic F-127, solução de PBS e PEG 6000 (diluído em água). Pelos resultados obtidos, o agente que melhor dispersaria os rGO seria o Pluronic 127 e o PEG 6000. O PEG 6000 foi utilizado em detrimento do Pluronic F-127 pois este é altamente tóxico para células em cultura [49] mas, ainda assim, o potencial zeta indicou alta instabilidade (aglomeração rápida). A formação desses aglomerados dificulta o alinhamento dos dipolos (alinhamento dos spins atômicos), o que, em última instância, dificulta a interação com o campo magnético gerado por cada canal iônico, exigindo maior força magnética do que aquela gerada pelo próprio campo magnético intrínseco. Sabe-se que quanto maior o número de dipolos alinhados, maior o campo magnético resultante em um material [50]. Da mesma forma, quando os dipolos não estão alinhados, o magnetismo resultante é baixo pois ocorre uma anulação dos campos magnéticos gerados por cada domínio. Para que ocorra o alinhamento de dipolos dentro de um material, deve-se aplicar uma força externa (força magnética) que force os dipolos ao novo alinhamento. Esta força é dependente da intensidade do campo magnético de indução (no caso, o campo magnético intrínseco neuronal é baixíssimo), ou seja, é mais fácil alinhar os dipolos das nanopartículas dispersas do que daquelas que estão agregadas ou até mesmo já internalizadas em células, pois estas últimas requerem maior intensidade de campo, portanto, maior força magnética (Raluca Morjan, 2003). Outra hipótese para explicar a rápida perda de efeito causada pela administração das nanopartículas é a distância entre os rGO e a fonte geradora do campo magnético (canal iônico em atividade no momento). O campo magnético registrado ao redor do canal é inversamente proporcional ao quadrado da distância, portanto, quando a nanopartícula é internalizada por qualquer célula, sua distância aumenta em relação ao canal gerador do campo, logo, a força magnética deve ser bem maior para o alinhamento dos dipolos [15], portanto, a capacidade de interação entre a nanopartícula e o campo magnético intrínseco é dificultada ou até perdida. Estudos, *in vitro*, demonstram que células apresentadoras de antígenos começam a internalizar nanotubos de carbono após 3 horas de incubação [51].

É sabido que nanopartículas magnéticas são internalizadas por células do sistema nervoso (oligodendrócitos, neurônios e sobretudo, micróglia), majoritariamente por endocitose [52]. Nossos resultados demonstraram que as nanopartículas são internalizadas por células do gânglio da raiz dorsal (DRG). A citometria de fluxo com células do DRG

incubadas por 24 horas com rGO-mag mostrou um aumento na granulosidade celular em relação às células do grupo controle (sem rGO-mag). Ademais, nossos resultado de microscopia confocal de células do DRG evidenciou a presença de nanopartículas dentro de variados tipos celulares. Em ambos os experimentos, não podemos distinguir exatamente o tipo celular que internalizou as nanopartículas, nem tampouco afirmar se há ou não degradação das mesmas. A sensibilização neuronal observada depende da distribuição das nanopartículas no meio extracelular (distância do ponto gerador do campo magnético de indução e orientação de seus dipolos). Contudo, nossos dados de citometria de fluxo (dados não mostrados) apontaram que em 3 horas (momento em que o efeito já está atenuado), a porcentagem de células que apresentaram aumento de granulosidade (indicativo de nanopartículas internalizadas) foi muito baixa e não diferia estatisticamente do controle, sugerindo, então, que a perda de efeito deva ter ocorrido, majoritariamente, em consequência da baixa estabilidade e consequente formação de grânulos e não por internalização das nanopartículas.

O papel do glutamato na transmissão do impulso nervoso e consequentemente da informação nociceptiva já é bem descrito. Como a liberação de glutamato depende da abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem e a sensibilização dos nociceptores depende da ativação de receptores de glutamato tipo NMDA, verificamos se a sensibilização induzida por rGO-mag depende de ativação de receptores de NMDA. Nossos dados demonstraram que a administração de CGS19755, um antagonista seletivo de receptor de NMDA impediu a sensibilização induzida por rGO-mag. Estes dados sugerem que a interferência magnética causada pela administração de rGO-mag interfere na liberação de glutamato, possivelmente por aumentar a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem que levam à maior liberação de glutamato. Contudo, diferentemente da sensibilização induzida por rGO-mag, a administração intratecal de glutamato ou NMDA induz o pico de sensibilização 3 horas após sua administração [39], enquanto rGO-mag induz sensibilização imediatamente após sua administração, com pico em 1 hora. Esta diferença pode ser explicada pelo fato da sensibilização induzida pela administração intratecal de glutamato ou NMDA ser dependente da ativação de receptores encontrados no Ganglio da Raiz Dorsal (GRD) e não da medula espinal e provavelmente não condicionada aos canais de cálcio dependentes de voltagem, pois no GRD não existem sinapses.

Todos os nossos resultados corroboram nossa hipótese de que as nanopartículas magnéticas rGO-mag perturbam o campo magnético neuronal e este, por sua vez aumenta a resposta neuronal.

Finalmente, é importante considerar que, embora os dados obtidos até o momento sugiram um papel do componente magnético do campo eletromagnético intrínseco na transmissão neuronal, não podemos descartar a possibilidade das alterações do campo magnético interferirem, por sua vez, no campo elétrico. Esta possibilidade existe por ser impossível dissociar os componentes magnético e elétrico do campo eletromagnético neuronal.

5. Conclusão

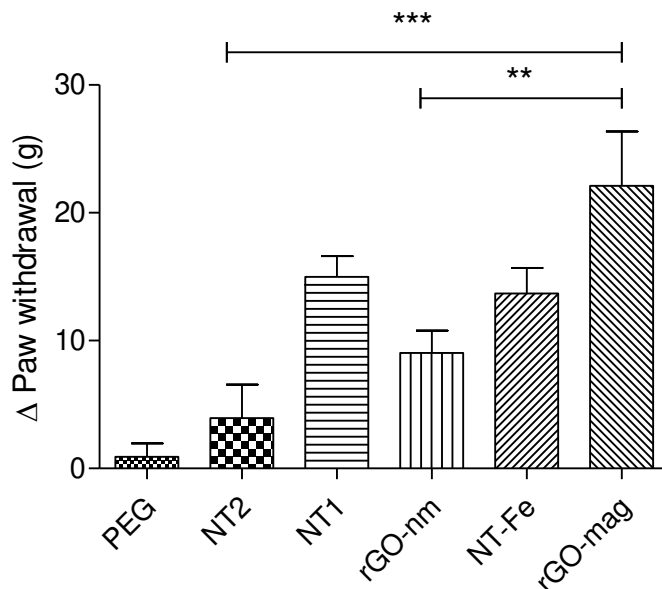
Os dados obtidos neste estudo demonstram que a perturbação do campo magnético intrínseco neuronal aumenta a excitabilidade do neurônio. Este fato, pelo menos, deixa claro que do ponto de vista biofísico, o campo eletromagnético formado pela corrente iônica ao longo das fibras neuronais e sinapses parece ser um fenômeno relevante na transmissão neuronal. Em uma perspectiva mais clínica, estes achados abrem novas possibilidades para que no futuro talvez possamos compreender melhor e à luz da ciência ocidental, formas terapêuticas milenares que supostamente utilizam a manipulação de campos magnéticos.

6. Perspectivas futuras

Este trabalho abre um novo campo de estudo, sobretudo ao trazer uma nova abordagem acerca do magnetismo e seus efeitos sobre o sistema nervoso. Ainda há muito o que se investigar dentro deste contexto, como por exemplo: padronização de técnicas eletrofisiológicas para a mensuração da hipótese até aqui mostrada, desenvolvimento de nanopartículas ferromagnéticas e diamagnéticas para a melhora dos controles e também um profundo estudo a respeito do comportamento das nanopartículas magnéticas e não magnéticas quando em contato com células do sistema nervoso e imunológico; mecanismos de internalização e tráfego intracelular.

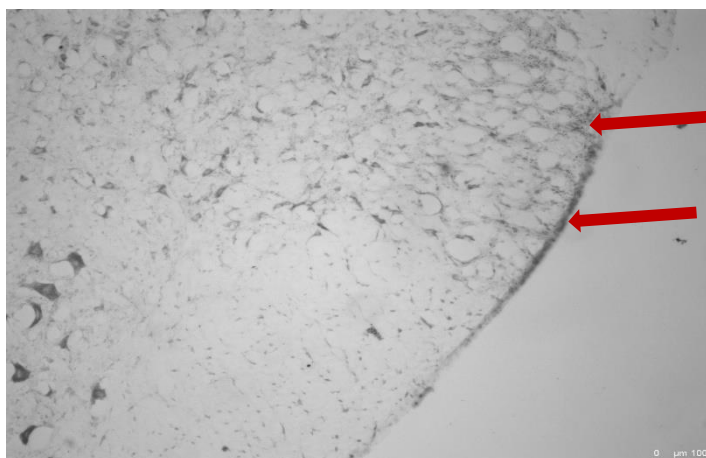
7. Dados suplementares

Resposta nociceptiva comportamental induzida por estímulo mecânico em ratos tratados com diferentes tipos de nanopartículas: nanotubos (NT1, NT2 e NTFe) e rGO-mag.



Teste do limiar mecânico de retirada da pata de ratos administrados com diferentes nanopartículas: NT-2, NT-1, rGO-nm, NT-Fe e rGO-mag. A nanopartícula rGO-mag demonstrou uma diminuição do limiar nociceptivo mais intensa que as demais nanopartículas. One way –ANOVA e Tukey post Hoc, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Histologia com corante Cresyl (internalização?)



Histologia de medula de rato, nível L4. Seta vermelha indica possível presença de rGO internalizada por células da medula. Figura não conclusiva.

8. Referências

1. Azanza, M.J. and A. del Moral, *Cell membrane biochemistry and neurobiological approach to biomagnetism*. Prog Neurobiol, 1994. **44**(6): p. 517-601.
2. Rudolph, K., et al., *Weak 50-Hz electromagnetic fields activate rat open field behavior*. Physiol Behav, 1985. **35**(4): p. 505-8.
3. Nossol, B., G. Buse, and J. Silny, *Influence of weak static and 50 Hz magnetic fields on the redox activity of cytochrome-C oxidase*. Bioelectromagnetics, 1993. **14**(4): p. 361-72.
4. Peric-Mataruga, V., et al., *The effect of a static magnetic field on the morphometric characteristics of neurosecretory neurons and corpora allata in the pupae of yellow mealworm Tenebrio molitor (Tenebrionidae)*. Int J Radiat Biol, 2008. **84**(2): p. 91-8.
5. Barak, Y., et al., *The effect of chlorpromazine and haloperidol on DNA transcription*. Int Clin Psychopharmacol, 1996. **11**(3): p. 193-7.
6. Venkataraman, K., *Epilepsy and solar activity--an hypothesis*. Neurol India, 1976. **24**(3): p. 148-52.
7. Kay, R.W., *Schizophrenia and season of birth: relationship to geomagnetic storms*. Schizophr Res, 2004. **66**(1): p. 7-20.
8. Wever, R., *[Influence of weak electromagnetic fields on the circadian periodicity of humans]*. Naturwissenschaften, 1968. **55**(1): p. 29-32.
9. Mathie, A., L.E. Kennard, and E.L. Veale, *Neuronal ion channels and their sensitivity to extremely low frequency weak electric field effects*. Radiat Prot Dosimetry, 2003. **106**(4): p. 311-6.
10. Barker, A.T., R. Jalinous, and I.L. Freeston, *Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex*. Lancet, 1985. **1**(8437): p. 1106-7.
11. Brigo, F., et al., *Transcranial magnetic stimulation of visual cortex in migraine patients: a systematic review with meta-analysis*. J Headache Pain, 2012. **13**(5): p. 339-49.
12. Antal, A., M.A. Nitsche, and W. Paulus, *Transcranial magnetic and direct current stimulation of the visual cortex*. Suppl Clin Neurophysiol, 2003. **56**: p. 291-304.
13. Borst, J.G. and B. Sakmann, *Effect of changes in action potential shape on calcium currents and transmitter release in a calyx-type synapse of the rat auditory brainstem*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1999. **354**(1381): p. 347-55.
14. Augustine, G.J., F. Santamaria, and K. Tanaka, *Local calcium signaling in neurons*. Neuron, 2003. **40**(2): p. 331-46.

15. Wikswo, J.P., J.P. Barach, and J.A. Freeman, *Magnetic field of a nerve impulse: first measurements*. Science, 1980. **208**(4439): p. 53-5.
16. Funk, R.H., T. Monsees, and N. Ozkucur, *Electromagnetic effects - From cell biology to medicine*. Prog Histochem Cytochem, 2009. **43**(4): p. 177-264.
17. Julius, D. and A.I. Basbaum, *Molecular mechanisms of nociception*. Nature, 2001. **413**(6852): p. 203-10.
18. Wijesinghe, R.S., *Magnetic measurements of peripheral nerve function using a neuromagnetic current probe*. Exp Biol Med (Maywood), 2010. **235**(2): p. 159-69.
19. Del Seppia, C., et al., *Pain perception and electromagnetic fields*. Neurosci Biobehav Rev, 2007. **31**(4): p. 619-42.
20. Choi, Y.M., et al., *Extremely low frequency magnetic field exposure modulates the diurnal rhythm of the pain threshold in mice*. Bioelectromagnetics, 2003. **24**(3): p. 206-10.
21. Jeong, J.H., et al., *Extremely low frequency magnetic field induces hyperalgesia in mice modulated by nitric oxide synthesis*. Life Sci, 2006. **78**(13): p. 1407-12.
22. Rao, C.N., et al., *Graphene: the new two-dimensional nanomaterial*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. **48**(42): p. 7752-77.
23. Shen, H., et al., *Biomedical applications of graphene*. Theranostics, 2012. **2**(3): p. 283-94.
24. Mestre, C., et al., *A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats*. J Pharmacol Toxicol Methods, 1994. **32**(4): p. 197-200.
25. Jensen, K., et al., *Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer*. Pain, 1986. **25**(3): p. 313-23.
26. Vivancos, G.G., et al., *An electronic pressure-meter nociception paw test for rats*. Braz J Med Biol Res, 2004. **37**(3): p. 391-9.
27. Kateb, B., et al., *Internalization of MWCNTs by microglia: possible application in immunotherapy of brain tumors*. Neuroimage, 2007. **37 Suppl 1**: p. S9-17.
28. Sicherman, B., *The uses of a diagnosis: doctors, patients, and neurasthenia*. J Hist Med Allied Sci, 1977. **32**(1): p. 33-54.
29. Martens, J.W., P.J. Koehler, and J. Vijselaar, *Magnetic flimmers: 'light in the electromagnetic darkness'*. Brain, 2013. **136**(Pt 3): p. 971-9.
30. Qin, S., et al., *A magnetic protein biocompass*. Nat Mater, 2016. **15**(2): p. 217-26.
31. Delgado Baquero, Y., et al., *[Transcranial magnetic stimulation. Clinical trials in psychiatry: therapeutic use]*. Actas Esp Psiquiatr, 2002. **30**(2): p. 120-8.
32. Hamilton, R., S. Messing, and A. Chatterjee, *Rethinking the thinking cap: ethics of neural enhancement using noninvasive brain stimulation*. Neurology, 2011. **76**(2): p. 187-93.

33. Tong, H., et al., *Regulation of Kv channel expression and neuronal excitability in rat medial nucleus of the trapezoid body maintained in organotypic culture*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 9): p. 1451-68.
34. Johnston, J., I.D. Forsythe, and C. Kopp-Scheinpflug, *Going native: voltage-gated potassium channels controlling neuronal excitability*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 17): p. 3187-200.
35. Purves, D., *Neuroscience*. 3rd ed. 2004, Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. xix, 773, 37 p.
36. Jang, J.H., et al., *Peripheral glutamate receptors contribute to mechanical hyperalgesia in a neuropathic pain model of the rat*. Neuroscience, 2004. **128**(1): p. 169-76.
37. Chertok, B., et al., *Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors*. Biomaterials, 2008. **29**(4): p. 487-96.
38. Cheng, H., et al., *Textile electrodes woven by carbon nanotube-graphene hybrid fibers for flexible electrochemical capacitors*. Nanoscale, 2013. **5**(8): p. 3428-34.
39. Muthoosamy, K., R.G. Bai, and S. Manickam, *Graphene and Graphene Oxide as a Docking Station for Modern Drug Delivery System*. Curr Drug Deliv, 2014.
40. Brauchle, E. and K. Schenke-Layland, *Raman spectroscopy in biomedicine - non-invasive in vitro analysis of cells and extracellular matrix components in tissues*. Biotechnol J, 2013. **8**(3): p. 288-97.
41. Wang, R., et al., *Generation of toxic degradation products by sonication of Pluronic(R) dispersants: implications for nanotoxicity testing*. Nanotoxicology, 2013. **7**(7): p. 1272-81.
42. Halliday, D., R. Resnick, and J. Walker, *Fundamentals of physics*. 7th ed. 2005, Hoboken, NJ: Wiley. 1 volume (various pagings).
43. Moraes, A.S., et al., *The suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells induced by multiwalled carbon nanotubes reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis*. CNS Neurosci Ther, 2013. **19**(9): p. 682-7.
44. Pinkernelle, J., et al., *Magnetic nanoparticles in primary neural cell cultures are mainly taken up by microglia*. BMC Neurosci, 2012. **13**: p. 32.
45. Basbaum, A.I., et al., *Cellular and molecular mechanisms of pain*. Cell, 2009. **139**(2): p. 267-84.
46. Ferreira, S.H., et al., *Bradykinin release of TNF-alpha plays a key role in the development of inflammatory hyperalgesia*. Agents Actions, 1993. **38 Spec No**: p. C7-9.
47. Nadeau, S., et al., *Functional recovery after peripheral nerve injury is dependent on the pro-inflammatory cytokines IL-1beta and TNF: implications for neuropathic pain*. J Neurosci, 2011. **31**(35): p. 12533-42.

48. Prado, F.C., et al., *Neuronal P2X3 receptor activation is essential to the hyperalgesia induced by prostaglandins and sympathomimetic amines released during inflammation*. Neuropharmacology, 2013. **67**: p. 252-8.
49. Terashima, T., et al., *Intrathecal P/Q- and R-type calcium channel blockade of spinal substance P release and c-Fos expression*. Neuropharmacology, 2013. **75**: p. 1-8.
50. Murakami, M., et al., *Antinociceptive effect of different types of calcium channel inhibitors and the distribution of various calcium channel alpha 1 subunits in the dorsal horn of spinal cord in mice*. Brain Res, 2004. **1024**(1-2): p. 122-9.
51. Takasusuki, T. and T.L. Yaksh, *Regulation of spinal substance p release by intrathecal calcium channel blockade*. Anesthesiology, 2011. **115**(1): p. 153-64.
52. Gundlfinger, A., et al., *Adenosine modulates transmission at the hippocampal mossy fibre synapse via direct inhibition of presynaptic calcium channels*. J Physiol, 2007. **582**(Pt 1): p. 263-77.
53. Bean, B.P., *Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence*. Nature, 1989. **340**(6229): p. 153-6.
54. Herlitze, S., et al., *Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits*. Nature, 1996. **380**(6571): p. 258-62.
55. Minor, D.L., Jr. and F. Findeisen, *Progress in the structural understanding of voltage-gated calcium channel (CaV) function and modulation*. Channels (Austin), 2010. **4**(6): p. 459-74.
56. Ferrari, L.F., et al., *Inflammatory sensitization of nociceptors depends on activation of NMDA receptors in DRG satellite cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(51): p. 18363-8.
57. Gadotti, V.M., et al., *Contribution of spinal glutamatergic receptors to the antinociception caused by agmatine in mice*. Brain Res, 2006. **1093**(1): p. 116-22.
58. Morris, C.E. and T.C. Skalak, *Acute exposure to a moderate strength static magnetic field reduces edema formation in rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(1): p. H50-7.
59. Hirai, T. and Y. Yoneda, *Functional alterations in immature cultured rat hippocampal neurons after sustained exposure to static magnetic fields*. J Neurosci Res, 2004. **75**(2): p. 230-40.
60. Sakurada, T., et al., *The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord*. Neuropharmacology, 1992. **31**(12): p. 1279-85.
61. Evangelista, S., *Novel therapeutics in the field of capsaicin and pain*. Expert Rev Clin Pharmacol, 2015. **8**(4): p. 373-5.

9. Apêndices

Certificado de conformidade com os princípios Éticos na experimentação animal – CEUA - UNICAMP

 UNICAMP	 CEUA/Unicamp
--	--

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Influência de nanopartículas magnéticas na resposta nociceptiva" (protocolo nº 2986-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada / Luis Paulo Bognoni Manzo, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 06 de março de 2013.

Campinas, 06 de março de 2013.

 Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente	 Fátima Alonso Secretária Executiva
--	--

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Influência de nanopartículas magnetizadas na sensibilização de neurônios nociceptivos**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 14 de outubro de 2016.

Assinatura : _____

Nome do(a) autor(a): **Luis Paulo Bognoni Manzo**

RG n.º 28863193-6

Assinatura : _____

Nome do(a) orientador(a): **Carlos Amilcar Parada**

RG n.º 7962382