



ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA ESTÁTICA: AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS

SARA FERREIRA NUNES¹; RONALDO FONTES DE PAULA CASTANHO.²;
RICARDO NETTO GOULART³, CAROLINE CRESPO DA COSTA⁴, IZABEL
CRISTINA CUSTÓDIO DE SOUZA⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – f.saranunes@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – ronaldofontespc@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – ricardonettogoulart@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – carolneuro@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – belcustodio20@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A estimulação magnética estática apresenta efeitos favoráveis relacionados a melhora de doenças neurológicas e psiquiátricas. (LEE, E. G. et al., 2016). Estudos têm mostrado diversos benefícios da estimulação magnética transcraniana (EMT), tanto em ensaios clínicos quanto estudos pré-clínicos. Contudo, os mecanismos desta terapêutica, em nível celular no sistema nervoso central, não são completamente elucidados. Na maioria dos estudos com estimulação magnética são utilizados astrócitos (*in vitro*) pois essas células estão em maior número no tecido cerebral.

Dentre as funções mais conhecidas dos astrócitos estão o suporte estrutural e metabólico para neurônios, auxílio na migração dos axônios em desenvolvimento, e a participação na transmissão sináptica (GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013). Outrossim, em meio às funções já referidas, estas unidades nervosas também apresentam importantes atividades quando em distúrbios neurológicos e/ou dano cerebral, expressando o aumento da proteína ácida glial (GPAP) (SCHILDGE *et al.*, 2013). E, como resultante desse aumento há a possibilidade de modificações do citoesqueleto astrocitário (MENET *et al.*, 2001) que podem estar vinculadas a alterações nas propriedades da membrana plasmática.

Sendo assim, considerando a importância funcional desta célula no sistema nervoso, o presente trabalho investigou as possíveis alterações geradas pela estimulação magnética estática em cultura de astrócitos — sendo avaliados os aspectos morfológicos e bioquímicos resultantes.

2. METODOLOGIA

Os astrócitos foram coletados do córtex cerebral de ratos Wistar neonatos com 1 dia de vida e semeados em placas de 24 poços com meio de cultivo (DMEM low glucose) que foi trocado a cada 3 ou 4 dias. As células foram colocadas em uma incubadora a 37° C de temperatura e 5% CO₂ e em aproximadamente 18 dias foram divididas em 4 grupos: grupo controle (C) que não foi submetido à estimulação magnética e os grupos que foram expostos a estimulação magnética durante 7 dias consecutivos, por 5 min (grupo 5), 15 min (grupo 15) e 30 min (grupo 30).

As estimulações magnéticas, foram feitas através de um dispositivo com ímãs de NeFeB (neodímio-ferro-boro) espaçados entre si para evitar a interação dos campos magnéticos. As células foram visualizadas no microscópio todos os dias do tratamento e fotografadas para analisar a morfologia. Após o último dia de estimulação celular o conteúdo proteico foi avaliado pelo ensaio colorimétrico sulforodamina B. Por fim, também foi determinada a concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Os resultados da análise estatística foram expressos como média \pm desvio padrão e considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise morfológica foi realizada por meio de imagens obtidas das culturas astrocitárias durante os 7 dias de estimulação, em todos os 4 grupos (Figura 1), não sendo evidenciada qualquer diferença morfológica entre eles. Entretanto, observou-se por meio do ensaio com sulforodamina B um aumento no conteúdo proteico nos grupos submetidos à 5 e 15 min de estimulação magnética estática, quando comparados ao controle ($p = 0,025$ e $p < 0,001$, respectivamente; Figura 2). Tal ensaio evidencia uma hiperplasia e hipertrofia de astrócitos, uma vez que o mesmo pode ser associado com a densidade celular (VICHAI; KIRTIKARA, 2006) e, pensando no importante papel dos astrócitos na proteção do cérebro, esta astrogliose poderia ser interpretada como um mecanismo de resposta à danos (ENG, Lawrence F; GHIRNIKAR; LEE, Yuen L, 2000). A sulforodamina B é um método colorimétrico que detecta proteínas celulares, sendo que a quantidade de corante extraída das células é diretamente proporcional a massa celular, porém não depende de uma reação metabólica celular, logo, não discrimina entre células funcionais e não-funcionais.

Ademais, o grupo estimulado por 5 min apresentou aumento dos níveis de EROs comparado ao controle ($p < 0,0001$), no entanto não foram observadas diferenças significativas nos demais tempo (Figura 3). Estudos anteriores mostram que a produção de EROs podem aumentar em células submetidas a um campo magnético, mas uma exposição prolongada reverte este aumento, corroborando nossos resultados (SULLIVAN; BALIN; ALLEN, 2011). Neste estudo apenas os menores tempos de exposição apresentaram alterações, desta forma, é possível que após determinado tempo de estimulação, ocorra uma adaptação celular a fim de manter a homeostase tecidual (CALABRESE; MATTSON, 2017).

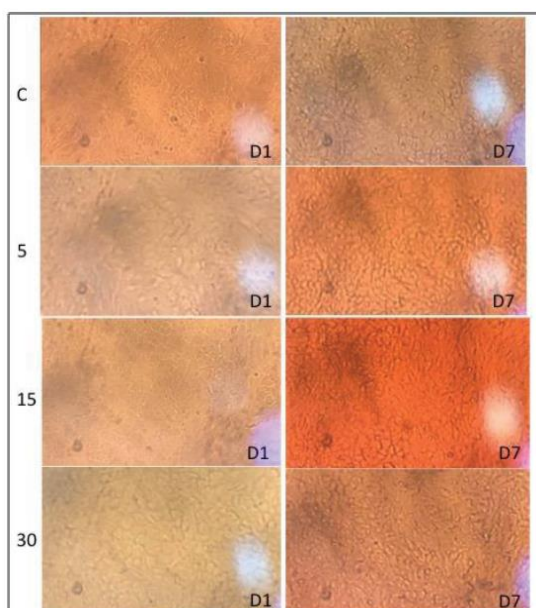


Figura 1. Imagens das culturas de astrócitos capturadas no primeiro (D1) e no sétimo dia (D7) de estimulação magnética estática. Grupos: C (controle), 5 (5 min de estimulação), 15 (15 min de estimulação) e 30 (30 min de estimulação). Aumento de 400x.

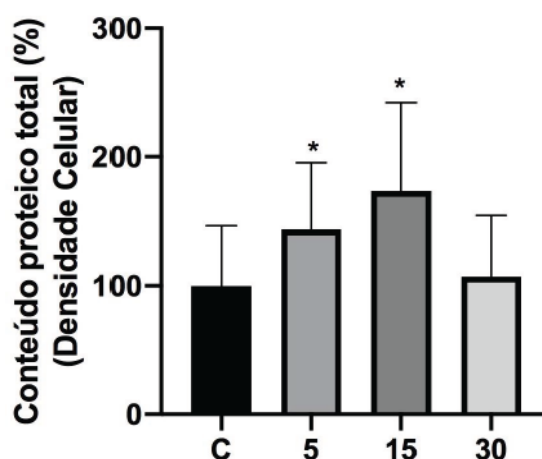


Figura 2. Efeitos da estimulação magnética estática sobre a densidade celular por conteúdo proteico total em astrócitos. Os astrócitos foram expostos a estimulação magnética estática por 5, 15 e 30 min durante 7 dias consecutivos.

*Significativamente diferente do controle: 5 min ($p=0,025$) e 15 min ($p<0,0001$)

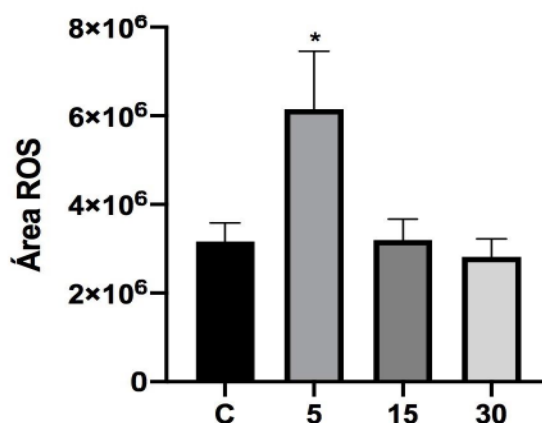


Figura 3. Efeitos da estimulação magnética estática sobre a produção de ROS em cultura de astrócitos. As culturas de astrócitos foram expostas a estimulação magnética estática por 5, 15 e 30 min durante 7 dias consecutivos.

*Significativamente diferente do controle ($p<0,0001$).

4. CONCLUSÕES

Após 7 dias de estímulo magnético estático não ocorreram alterações morfológicas em astrócitos. Contudo, o ensaio sulforadamina B demonstrou um possível aumento na densidade celular nos tempos de 5 e 15 min de estimulação, enquanto apenas o tempo de 5 min apresentou aumento na produção de EROs, sugerindo uma alteração no metabolismo celular. O mesmo não ocorreu nos maiores tempos de estimulação, o que pode evidenciar uma possível capacidade adaptativa da célula ao insulto.



Assim sendo, mais estudos são necessários a fim de elucidar os efeitos da estimulação magnética estática sobre a funcionalidade destas células em relação a outros parâmetros.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CALABRESE, Edward J.; MATTSON, Mark P. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? **npj Aging and Mechanisms of Disease**, v. 3, n. 1, 2017.

ENG, Lawrence F.; GHIRNIKAR, Roopa S.; LEE, Yuen L. **Neurochemical Research**, v. 25, n. 9/10, p. 1439–1451, 2000.

FREGNI, F.; BOGGIO, P. S.; BRUNONI, A. **Neuromodulação Terapêutica: Princípios e Avanços da Estimulação Cerebral Não Invasiva em Neurologia, Reabilitação, Psiquiatria e Neuropsicologia**. primeira ed. São Paulo: Sarvier, 2012.

GOMES, Flávia Carvalho Alcantara; TORTELLI, Vanessa Pereira; DINIZ, Luan. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 61–84, 2013.

LEE, E. G.; DUFFY, Walter; HADIMANI, R. L.; *et al.* Investigational Effect of Brain-Scalp Distance on the Efficacy of Transcranial Magnetic Stimulation Treatment in Depression. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 52, n. 7, p. 1–4, 2016.

MENET, Véronique; GIMÉNEZ Y RIBOTTA, Minerva; CHAUVET, Norbert; *et al.* Inactivation of the Glial Fibrillary Acidic Protein Gene, But Not That of Vimentin, Improves Neuronal Survival and Neurite Growth by Modifying Adhesion Molecule Expression. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 16, p. 6147–6158, 2001.

LOZANO-SOTO, Elena; SOTO-LEÓN, Vanesa; SABBARESE, Simona; *et al.* Transcranial static magnetic field stimulation (tSMS) of the visual cortex decreases experimental photophobia. **Cephalalgia**, v. 38, n. 8, p. 1493–1497, 2017.

SULLIVAN, Katherine; BALIN, Arthur K.; ALLEN, Robert G. Effects of static magnetic fields on the growth of various types of human cells. **Bioelectromagnetics**, v. 32, n. 2, p. 140–147, 2010.

VICHAJ, Vanicha; KIRTIKARA, Kanyawim. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.