

ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA ESTÁTICA E ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE CORRENTE CONTÍNUA COM ÊNFASE NO EQUILÍBRIO OXIDATIVO APLICADOS NA PRÁTICA DE CULTIVO CELULAR DE ASTRÓCITOS.

LETÍCIA DEVANTIER KRÜGER¹; CAROLINE CRESPO DA COSTA²; GIOVANA DUZZO GAMARO²; IZABEL CRISTINA CUSTÓDIO DE SOUZA³

¹Universidade Federal de Pelotas – leticiadevantier@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – carolneuro@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – giovanagamaro@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – belcustodio20@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A Estimulação Transcraniana Magnética Estática e a Estimulação Elétrica Transcraniana de Corrente Contínua são técnicas consideradas não invasivas, econômicas e fáceis de aplicar, sendo utilizadas com a finalidade de reduzir a excitabilidade cortical (MATSUMOTO et al., 2023). Ambas formas de estimulação vem ganhando espaço como tratamento para diferentes patologias que afetam o sistema nervosa central, como, depressão, Parkinson, epilepsia e dor neuropática (CRESPO et al., 2023; RIVADULLA et al., 2023).

Apesar de serem práticas já aplicadas na clínica, os efeitos em células de forma isolada ainda não são bem compreendidos, tanto em culturas saudáveis quanto em cultivos com insultos patológicos. Dentre as linhagens disponíveis para o estudo em cultivo primário estão os astrócitos que desempenham papel fundamental na homeostase cerebral. Portanto, o presente estudo teve como objetivo demonstrar os efeitos da Estimulação Magnética Estática (EME) em cultivo celular primário de astrócitos normais/saudáveis e propor a continuidade desses estudos com um outro método de estimulação, a Estimulação Elétrica de Corrente Contínua (ECC).

2. METODOLOGIA

2.1 CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS

Foram utilizados o córtex de ratos Wistar neonatos (1 a 3 dias de vida) obtidos no Biotério Central da Universidade. Os córtex foram dissecados mecanicamente e adicionados a uma solução tampão que foi submetida a centrifugação a 1400 rpm por 7 minutos e o pellet ressuspendido com meio DMEM (enriquecido com soro fetal bovino a 10%, gentamicina e anfotericina B, antibiótico e antifúngico, respectivamente) (FUNCHAL et al., 2014; SCHILDGE et al., 2013).

2.2 EME EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS

Foram utilizadas placas de 24 poços previamente impregnadas com poli-L-lisina. Em cada poço foi semado um total de 70.000 células; em seguida as placas foram acondicionadas em incubadora com temperatura e CO₂ controlados (37°C e 5%, respectivamente). A cada 3 ou 4 dias foi realizada a troca do meio DMEM das placas e após cerca de 18 dias, após as culturas atingirem a confluência foi iniciado o processo de estimulação. Para isso, foram divididas em 5 grupos, Controle (não

estimulado), 5 min, 15 min, 30 min e 40 min de estimulação. Cada placa foi submetida ao respectivo tempo de EME 1 vez ao dia por 7 dias consecutivos. Após o último dia de estimulação foram analisadas as enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), a capacidade antioxidante total (ACAP), os níveis de sulfidril (SH) e os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (AEBI, 1984; AKSENOV & MARKESBERRY, 2001; AMADO et al., 2009; FEDERICI et al., 2007; MISRA & FRIDOVICH, 1972).

O dispositivo de EME foi construído exclusivamente pelo Laboratório de Engenharia Biomédica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para testar a aplicação de EME em culturas celulares. O aparelho consiste em uma placa suporte de 24 poços com ímãs com forma cilíndrica de 12x6 mm (diâmetro x altura) e a força da estimulação foi de 305 mT ($\pm 2\%$ de tolerância), que é um campo moderado.

2.3 ECC EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS

Os ensaios com a ECC ocorrerão da mesma forma que da EME descrita acima. Os mesmos parâmetros serão avaliados a fim de realizar comparações entre as técnicas. As únicas diferenças serão as placas que nesse caso serão utilizadas de 12 poços sendo semeadas 300.000 células por poço, sendo divididas em 5 grupos, controle (não estimulado), 5 min, 15 min, 30 min e 40 min de estimulação, após atingirem a confluência, cada placa será submetida ao respectivo tempo de ECC 1 vez ao dia por 7 dias consecutivos e 24h após o último dai passaram pelos ensaio de CAT, SOD, ACAP, SH e TBARS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 A EME DESFAFORECE O EQUILÍBRIO OXIDATIVO DA CULTURA DE ASTRÓCITOS

A defesa antioxidante é fundamental para a manutenção e sobrevivência dos astrócitos e algumas enzimas desempenham um papel importante nessa função, dentre elas, destacam-se CAT e a SOD. Além disso, a ACAP, o grupamento SH e os níveis TBARS também são relevantes para a complementação dos achados quanto ao equilíbrio oxidativo.

A EME provocou algumas alterações nesse equilíbrio. A ACAP apresentou diminuição nos tempos de estimulação de 5 e 40min, enquanto os níveis de TBARS aumentaram em todos os tempos de exposição a EME quando comparado ao grupo controle (CT). Em contrapartida, as enzimas CAT, SOD e o grupo SH não apresentaram resultados estatisticamente significativos (tab. 1).

Tabela 1. Resultados da EME em cultivo de astrócitos

Parâmetros	CT	5min	15min	30min	40min
ACAP	-	↓	-	-	↓
CAT	-	-	-	-	-
SOD	-	-	-	-	-
SH	-	-	-	-	-
TBARS	-	↑	↑	↑	↑

Análise de ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Resultados significativos com $p < 0,05$.

Foi observado que houve uma desconexão entre os resultados de estresse oxidativo, havendo ao mesmo tempo, aumento de peroxidação lipídica e redução da capacidade total antioxidante indicando a presença elevada de espécies reativas ao oxigênio enquanto as enzimas antioxidantes mantiveram seus níveis normais entre os grupos. Esses resultados indicam uma desestabilização do equilíbrio oxidativo.

Uma possível justificativa para esse perfil de resultados pode ser em relação ao possível envolvimento de outras vias antioxidantes não avaliadas. Além disso, não se pode desconsiderar totalmente a hipótese de que a EME pode ter causado uma ativação dessas células tornando-as reativas podendo levar a esse efeito de aumento de espécies reativas (BOLAÑOS, 2016; MCBEAN, 2017).

3.2 EME E ECC EM CULTURAS PRIMÁRIAS DE ASTRÓCITOS E A UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS SAUDÁVEIS.

Tanto a EME já utilizada em culturas de astrócitos quanto a ECC são utilizadas em cultivos de células normais/saudáveis, mas qual seria o intuito dessa análise se poderiam ser utilizadas como método de tratamento frente a insultos e visto que já são utilizadas em práticas pré-clínicas e clínicas? Atualmente, existem alguns estudos em roedores e humanos avaliando a ação da EME e da ECC como tratamento de doenças que afetam o cérebro (BEROS et al., 2024; LI et al., 2022; SALEHINEJAD et al., 2022; SOTO-LEÓN et al., 2022). Entretanto, a nível celular ainda são escassas as pesquisas quanto aos efeitos de ambas as estimulações. A partir do cultivo em células específicas do cérebro é possível elucidar mais precisamente mecanismos fisiológicos e bioquímicos principalmente em linhagens saudáveis para que a partir disso seja possível aplicar em cultivos de células induzidas a diferentes patologias. A utilização prévia em culturas normais/saudáveis permite determinar com mais precisão esses efeitos do que quando apenas utilizado um grupo controle em experimentos, principalmente quando se está utilizando como método terapêutico de protocolos e doenças ainda não estudadas em culturas.

4. CONCLUSÕES

Dado o exposto, se conclui que os resultados obtidos por meio da EME em cultivo primário de astrócitos são inovadores, mostrando a nível celular algumas das alterações que podem ser causadas e auxiliando na determinação do delineamento de novas pesquisas e protocolos. Da mesma forma será realizado com a ECC sendo possível fazer uma comparação de resultados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105(C), p.121–126, 1984.
AKSENOV, M. Y., & MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v.302(2–3), p.141–145, 2001.

- AMADO, L. L., GARCIA, M. L., RAMOS, P. B., et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxyl radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of The Total Environment**, v.407, n.6, p.2115–2123, 2009.
- BEROS, J. L., KING, E. S., CLARKE, D., et al. Static magnetic stimulation induces structural plasticity at the axon initial segment of inhibitory cortical neurons. **Scientific Reports**, v.14, n.1, 2024.
- BOLAÑOS, J. P. Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. **Journal of Neurochemistry**, v.139, p.115–125, 2016.
- CRESPO, P. C., MARTINS, L. A. M., MARTINS, O. G. Short-term effectiveness of transcranial direct current stimulation in the nociceptive behavior of neuropathic pain rats in development. **AIMS Neuroscience**, v.10, n.4, p.433–446, 2023.
- FEDERICI, G., SHAW, B. J., & HANDY, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v.84, n.4, p.415–430, 2007.
- FUNCHAL, C.; DANI, C. **Neurociência: Modelos experimentais em animais**. Porto Alegre: Editora Universitária Metodista IPA: EDIPUCRS, 2014.
- LI, Q., FU, Y., LIU, C., & MENG, Z. Transcranial Direct Current Stimulation of the Dorsolateral Prefrontal Cortex for Treatment of Neuropsychiatric Disorders. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v.16, p.1-16, 2022.
- MATSUMOTO, T., WATANABE, T., ITO, K., et al. Effect of transcranial static magnetic stimulation over unilateral or bilateral motor association cortex on performance of simple and choice reaction time tasks. **Frontiers in Human Neuroscience**, v.17, p.1-17, 2023.
- MCBEAN, G. J. Cysteine, glutathione, and thiol redox balance in astrocytes. **In Antioxidants**, v.6, n.3, 2017.
- MISRA, H. P., & FRIDOVICH, I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v.247, n.10, p.3170–3175, 1972.
- RIVADULLA, C., PARDO-VAZQUEZ, J. L., DE LABRA, C., et al. Transcranial static magnetic stimulation reduces seizures in a mouse model of Dravet syndrome. **Experimental Neurology**, v.370, 2023.
- SALEHINEJAD, M. A., GHANAVATI, E., GLINSKI, B., et al. A systematic review of randomized controlled trials on efficacy and safety of transcranial direct current stimulation in major neurodevelopmental disorders: ADHD, autism, and dyslexia. **Brain and Behavior**, v.12, n.9, 2022.
- SCHILDGE, S. et al. Isolation and Culture of Mouse Cortical Astrocytes. **Journal of Visualized Experiments**, n.71, p.1-7, 2013.
- SOTO-LEÓN, V., TORRES-LLACSA, M., MORDILLO-MATEOS, L., et al. Static magnetic field stimulation over motor cortex modulates resting functional connectivity in humans. **Scientific Reports**, v.12, n.1, 2022.