

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção

Tese



**Avaliação dos efeitos da estimulação magnética estática em
cultura primária de astrócitos**

Caroline Crespo da Costa

Pelotas, 2020

Caroline Crespo da Costa

**Avaliação dos efeitos da estimulação magnética estática em
cultura primária de astrócitos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial a obtenção do título de Doutor em Ciências (área Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Izabel Cristina Custódio de Souza

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Giovana Duzzo Gamaro

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C837a Costa, Caroline Crespo da

Avaliação dos efeitos da estimulação magnética
estática em cultura primária de astrócitos / Caroline Crespo
da Costa ; Izabel Cristina Custódio de Souza, orientadora ;
Giovana Duzzo Gamaro, coorientador. — Pelotas, 2020.

101 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação
Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas
Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de
Pelotas, 2020.

1. Estimulação magnética estática. 2. Cultura de
astrócitos. 3. Viabilidade celular. 4. Estresse oxidativo. 5.
Mitocondria. I. Souza, Izabel Cristina Custódio de, orient. II.
Gamaro, Giovana Duzzo, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

Caroline Crespo da Costa

Avaliação dos efeitos da estimulação magnética estática em cultura primária de astrócitos

Tese aprovada, como requisito parcial, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (área Bioquímica e Bioprospecção), Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 15/12/2020

Banca examinadora:



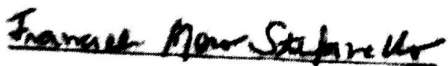
Prof^a. Dr^a. Izabel Cristina Custódio de Souza (Orientadora)
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil



Prof. Dr. Marcos Roberto de Oliveira
Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil



Prof^a. Dr^a. Liciane Fernandes Medeiros
Doutora em Ciências Biológicas (Fisiologia) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil



Prof^a. Dr^a. Francieli Moro Stefanello
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil

Agradecimentos

Desejo agradecer a todos aqueles que, de alguma forma, tornaram possível que este Doutorado se concretizasse.

Agradeço a Prof^a. Izabel Cristina Custódio de Souza que, mais que orientadora, foi uma amiga, pois em todos os momentos esteve disposta a auxiliar, nunca negando uma palavra de atenção mesmo quando estava mais assoberbada. Foi quem mais me incentivou a iniciar esta etapa da minha vida, com certeza se não fosse a oportunidade dada por ela não estaria aqui hoje.

Agradeço a Prof^a. Giovana Duzzo Gamaro, por ser uma co-orientadora presente, atuante e sempre disposta a ajudar.

Agradeço as minhas colegas de doutorado Priscila Crespo e Ana Paula Ferreira que me permitiram dividir as angustias, sempre dando uma palavra de estímulo, e a Alessandra Cortes que me ensinou muitas coisas em relação ao trabalho de bancada.

Aos alunos de iniciação científica, em especial a Jéssica Obelar que esteve ao meu lado durante todo o período de experimentos, abrindo mão muitas vezes das suas atividades para me ajudar, sempre com entusiasmo, idéias novas e me mostrando outros pontos de vista sempre apropriados para o momento, realmente não tenho palavras para agradecer a Jessica.

Agradeço ao André Koth que caiu do céu e me ajudou muito na parte inicial e final deste processo...foi incansável.

Agradeço aos técnicos de laboratório Leandro Duro, Eliane Antonissen, Luiz Augusto Cruz e Luiz Otávio Centeno. Foram todos fundamentais para que a pesquisa desse certo.

Aos professores Geferson Fisher, Marcelo de Lima, Silvia Hubner, Gilberto Vargas e Paulo Centeno e ao querido Zeca (José Carlos Sandrini) que além de permitirem a realização dos experimentos no laboratório de virologia e Imunologia da UFPel, auxiliaram muito através de seus ensinamentos e disposição em resolver quaisquer problemas que aparecessem, não tenho dúvidas em dizer que o experimento só se tornou possível graças a ajuda deles. E meu muito obrigado a todos os alunos daquele laboratório que sempre estiveram dispostos a ajudar.

Agradeço a prof^a. Anelise Félix e a todos os funcionários do Biotério.

Agradeço aos colegas do PPGBBIO em especial a Nathalia Pedra, a Mayara Soares e a Prof^a. Rosélia que me auxiliaram muito desde o início dos experimentos.

Agradeço a prof^a. Carolina Gioda e a Eduarda pelo auxílio nas análises, nas interpretações e pela disposição em responder qualquer dúvida.

A Larissa Bobermin que me mostrou suas técnicas de cultivo.

Aos colegas de departamento, por permitirem que eu me afastasse das atividades docentes durante o período de Doutorado, assumindo maior carga horária.

A minha família...estes não auxiliaram diretamente na pesquisa mas foram sempre a estrutura para que eu pudesse me dedicar estes 4 anos a uma proposta bem diferente do que eu vinha fazendo:

- Minha mãe Lisarb e minha avó Lígia sempre do meu lado, dando força e estímulo para que eu seguisse em frente e não desanimasse, meu Pai Paulo Eduardo, entendendo quando não era possível que eu me reunisse com a família;

- Meu marido, companheiro, amigo e grande amor Márcio Guerreiro, sempre ao meu lado, suprimo minha ausência no cuidado com as crianças e nas atividades domésticas e ao mesmo tempo auxiliando diretamente nos experimentos com sugestões e palavras de conforto nos momentos de estresse;

- Aos meus amados filhos Marcos, Felipe e Mariana que, mesmo sentindo muito minha falta me apoiaram a seguir em frente.

Agradeço ao PPGBBIO pela oportunidade de fazer minha pós-graduação.

Agradeço a Universidade Federal de Pelotas que me recebeu de braços abertos desde minha graduação.

Agradeço o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)

E acima de tudo agradeço a Deus por ter sempre colocado pessoas especiais e fundamentais no meu caminho, no momento certo e na hora certa.

Resumo

COSTA, Caroline Crespo da. **Avaliação dos efeitos da estimulação magnética estática em cultura primária de astrócitos**. 2020. 101f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas- área de concentração Bioquímica e Bioprospecção) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

O uso de dispositivos de estimulação magnética para tratamento de patologias neurológica vem crescendo ao longo do tempo, por ser um método não invasivo com poucos efeitos adversos. A busca por terapias eficazes vem sendo o foco desta modalidade de intervenção que, na maioria das vezes, é usado como método adjuvante ao tratamento convencional. Além disso, os organismos estão continuamente expostos a campos eletromagnéticos ambientais, pelo aumento do uso de aparelhos que emitem algum tipo de radiação. Os astrócitos são células do sistema nervoso central que desempenham papel fundamental na neurogênese, na transmissão sináptica, na barreira hemato-encefálica e no desenvolvimento de circuitos cerebrais, estando em íntima relação dinâmica com os neurônios. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da estimulação magnética estática de média intensidade sobre a viabilidade celular, a função mitocondrial e os parâmetros de estresse oxidativo de astrócitos obtidos de cultura primária de córtex cerebral de ratos Wistar neonatos. Após adquirirem confluência, em torno do 18º dia, as células em cultivo foram divididas em cinco grupos: controle (que não recebeu estímulo magnético) e os que receberam estimulação magnética estática de 305mT por 5min, 15min, 30min e 40min diários durante 7 dias consecutivos. Logo após o último dia de estimulação foram realizadas as análises. Os resultados foram analisados usando ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Tukey. As análises mostraram uma redução de viabilidade celular em todos os grupos estimulados, e um aumento na morte por necrose nos grupos estimulados por 15min, 30min e 40min. Houve uma redução na razão função/massa mitocondrial evidenciando uma diminuição na atividade mitocondrial em todos os grupos estimulados. Em relação aos resultados dos parâmetros de estresse oxidativo e perfil antioxidante, as células estimuladas apresentaram um aumento na peroxidação lipídica. Além disso, foi identificado uma menor capacidade antioxidante total nas células estimuladas por 5min e 40min e maior produção de espécies reativas de oxigênio no grupo 5min. Por outro lado, não houve diferenças entre o grupo controle e os grupos estimulados na atividade das enzimas SOD e CAT, sequer no conteúdo tiólico total. Ainda, foi observado um aumento na fluidez de membrana, seguido de retenção das células na fase G1 e redução da população celular na fase G2 do ciclo celular no grupo estimulado por 40min. Os demais grupos não apresentaram alteração no ciclo celular. Estes resultados sugerem que os astrócitos são células suscetíveis ao campo magnético estático moderado de 305mT e podem sofrer redução na viabilidade, na atividade mitocondrial e aumento na peroxidação lipídica em diferentes tempos de exposição diária por 7 dias consecutivos. Sendo assim, há a necessidade de se reavaliar parâmetros de campo magnético considerados, até então, seguros.

Palavras-chave: estimulação magnética estática, cultura de astrócitos, viabilidade celular, estresse oxidativo, mitocôndria

Abstract

COSTA, Caroline Crespo da. **Evaluation the effects of static magnetic stimulation in primary astrocyte culture**. 2020. 101f. Thesis (Doctorate in Biological Sciences – Biochemistry and Bioprospecting concentration área) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

The use of magnetic stimulation devices for treatment of neurological pathologies has grown over time, because it is a non-invasive method with few adverse effects. The search for effective therapies has been the focus of this type of intervention that, in most cases, is used as an auxiliary method to conventional treatment. In addition, organisms are continuously exposed to electromagnetic field due to the increased use of devices that emit some type of radiation. Astrocytes are central nervous system cells that play a fundamental role in neurogenesis, synaptic transmission, blood-brain barrier and development of brain circuits, being in dynamics close relationship with neurons. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of medium-intensity static magnetic stimulation in a primary culture of cortical astrocytes obtained from neonatal Wistar rats, on viability, mitochondrial function and oxidative stress. After reaching confluence (18th day), the cells were split into five groups: control (received no magnetic stimulus), and stimulated groups that received daily static magnetic stimulation of 305mT for 5min, 15min, 30min and 40min for 7 consecutive days. After the last stimulation, analysis was performed. The data were analysed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test. We found a reduction of cell viability in all stimulated groups and an increase in death by necrosis in 15min, 30min and 40min stimulated groups. There was a reduction in the function/mitochondrial mass ratio, evidencing a decrease in mitochondrial activity in all stimulated groups. Regarding the results of oxidative stress and antioxidante profile, the stimulated cells showed an increase in lipid peroxidation. It was also identified a lower total antioxidante capacity of the cells stimulated for 5min and 40min and greater production of reactive oxygen species in the group 5min. On the other hand, no differences between the control and stimulated groups it was observed in the activity of the SOD and CAT enzymes, not even in the total thiol content. In addition, an increase in membrane fluidity followed by cell arrest in G1 phase and a reduction the cell population in the G2 phase was observed in the 40min group. The other groups showed no change in the cell cycle. These results suggest that astrocytes are susceptible cells to a moderate static magnetic field of 305mT, and they can undergo reduction in viability, in the mitochondrial activity and an increase in lipid peroxidation at diferente times of daily exposure for seven consecutive days. Therefore, it's necessary review magnetic field parameters considered safe.

Key-words: static magnetic stimulation, astrocyte culture, cell viability, oxidative stress, mitochondria,

Lista de Figuras

Figura 1	Fluxograma da busca literária	Pg 15
Figura 2	Cultura primária de astrócito	Pg 19
Figura 3	Modelo de estimulador magnético transcraniano	Pg 21

Lista de Tabelas

Tabela 1	Resumo dos resultados	Pg 87
----------	-----------------------	-------

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACAP	Capacidade antioxidante
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazol-propionico
AVC	Acidente vascular cerebral
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CAT	Catalase
CMD	Campo magnético dinâmico
CME	Campo magnético estático
EM	Estimulação magnética
EME	Estimulação magnética estática
EMT	Estimulação magnética transcraniana
ETCC	Estimulação transcraniana por Corrente contínua
G	Gauss
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GDNF	Fator neurotrófico derivado de células gliais
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
LabVir	Laboratório de virologia e Imunologia da UFPel
MDA	Malondialdeído
MTG	MitoTraker Green
MTR	MitoTraker Red
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
ml	mililitro
mT	mili Tesla
NeFeB	Neodímio-ferro-boro
NGF	Fator de crescimento do nervo
NMDA	N-metil-D-aspartato
rTMS	Estimulação magnética transcraniana repetitiva
ROS	Espécies reativas do oxigênio
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase

T	Tesla (unidade internacional de campo magnético)
TMS / EMT	Estimulação magnética transcraniana
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
VIM	Filamentos intermediários vimentina
µg	Microgramas

Sumário

1. Introdução	12
2. Objetivos	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3. Revisão da Literatuta	15
3.1 Astrócitos.....	15
3.1.2 Cultura de astrócitos.....	18
3.2 Estimulação magnética.....	20
3.2.1 Estimulação magnética transcraniana.....	21
3.2.1.1 Estimulação magnética dinâmina em culturas celulares.....	23
3.2.2 Estimulação magnética estática.....	24
3.2.2.1 Estimulação magnética estática e viabilidade celular.....	25
3.2.2.2 Estimulação magnética estática e estresse oxidativo.....	25
3.2.2.3 Estimulação magnética estática x ciclo celular e membrana celular.....	26
4. Resultados	27
4.1 Artigo 1.....	28
4.2 Manuscrito 2.....	43
5. Considerações finais	86
5.1 Limitações.....	87
5.2 Perspectivas.....	88
Referências	89
Anexos	98

1 Introdução

As estimulações cerebrais não invasivas, assim como a estimulação magnética transcraniana, têm sido amplamente utilizadas como tratamento adjuvante de várias patologias neurológicas e psiquiátricas. Para um melhor entendimento do seu mecanismo de ação, esta terapêutica vem sendo alvo de uma vasta gama de pesquisas. Os resultados destas pesquisas são bastante heterogêneos, alguns com efeitos promissores e outros inconclusivos. Além do uso terapêutico, sabe-se que todos os organismos vivos, especialmente os humanos, sofrem continuamente exposição ambiental a campos magnéticos, como por exemplo os provenientes de estações transmissoras de serviços de telecomunicações, campos emitidos por aparelhos diagnósticos entre outros (BODEGA *et al.*, 2005; ZHANG, L. *et al.*, 2016).

Apesar de um notável número de pesquisas sendo realizadas nesta área, ainda há um conhecimento limitado em relação ao efeito a nível molecular e celular. Estudos em animais têm sido fundamentais na identificação dos mecanismos pelos quais a estimulação transcraniana poderia produzir os efeitos clínicos. Essas estimulações não são apenas neuromodulatórias, mas também podem induzir neuroplasticidade e exercer efeito neuroprotetor em roedores (CAPPON; JAHANSHAH; BISIACCHI, 2016; FREGNI; BOGGIO; BRUNONI, A., 2012; IM, S. H. *et al.*, 2010; KAMIDA *et al.*, 2011).

Os efeitos da estimulação magnética (EM) em cultura celular ainda são pouco estudados, principalmente utilizando cultura primária de células do sistema nervoso. Durante o tratamento clínico com estimulação magnética, tanto as células patológicas, como as saudáveis podem sofrer a ação do campo magnético. Desta forma, estudos com células neurais como os astrócitos, são importantes, já que são células que desempenham um papel chave no funcionamento do SNC.

O entendimento sobre os mecanismos pelos quais a estimulação magnética desenvolve suas ações são muito importantes, pois as metodologias aplicadas na neuroestimulação terapêutica dependem destas informações. Isso pode ser crucial para o direcionamento da região cerebral que se quer atingir e para compreender o resultado da terapia. Desta forma, colaborando para o desenvolvimento de

protocolos de tratamento e novas abordagens para estimulação das diferentes áreas cerebrais (STERN *et al.*, 2017).

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da estimulação magnética estática sobre cultura primária de astrócitos obtidos de córtex cerebral de ratos Wistar.

2.2 Objetivos específicos

-Estabelecer condições de cultivo primário de astrócitos de córtex cerebral de ratos Wistar neonatos;

-Estabelecer condições de estimulação magnética estática em cultura primária de astrócitos, por meio do dispositivo desenvolvido pela Bioengenharia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre;

-Expor astrócitos obtidos de cultivo primário, a campo magnético estático de 305mT, por 5min, 15min e 30min diários por 7 dias consecutivos e avaliar:

- Morfologia celular
- Densidade Celular por meio do ensaio Sulforodamina B
- Espécies reativas de oxigênio (ROS)

-Expor astrócitos obtidos de cultivo primário, a campo magnético estático de 305mT, por 5min, 15min, 30min e 40min diários por 7 dias consecutivos e avaliar:

- Viabilidade celular por meio dos ensaios de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e de exclusão por azul de Trypan
- Morte celular (necrose/ apoptose), ciclo celular e fluidez de membrana por meio de citometria de fluxo
- Atividade e massa mitocôndrial por meio do método de fluorometria, utilizando marcador fluorescente MitoTraker Red (MTR) e MitoTraker Green (MTG)
- A quantidade de GFAP por meio de imunocitoquímica;
- Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), conteúdo tiólico total, capacidade antioxidante (ACAP) e peroxidação lipídica (TBARS)

3 Revisão da literatura

Na busca literária, foi levado em consideração, a estimulação magnética, estimulação magnética estática, células neurais e cultura de astrócitos. A estratégia de busca envolveu três bases de dados: PubMed, Lilacs e Scielo, sem restrição de data de publicação. Abaixo encontra-se o fluxograma (Figura 1) representando o número de artigos disponíveis nas bases de dados pesquisadas.

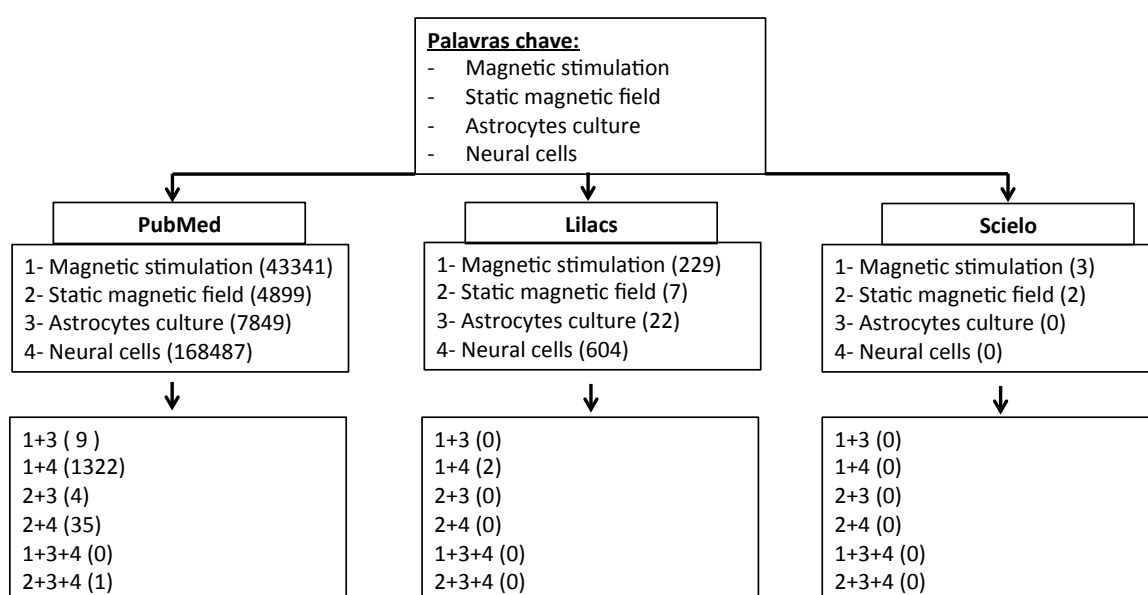


Figura 1: Fluxograma da busca literária realizada nas três bases de dados, com o número de artigos encontrados em cada uma delas.

3.1 Astrócitos

Os astrócitos foram primeiramente descritos por Rudolf Virchow como um tecido conjuntivo homogêneo que suportava os elementos do sistema nervoso. O termo astrócitos foi introduzido em 1895 por Lenhossek, baseado na sua morfologia, que apresenta múltiplos prolongamentos que se irradiam do corpo celular lembrando a forma de uma estrela (AKDEMIR; HUANG, A. Y.; DENEEN, 2020; LENHOSSEK, 1891; MATYASH; KETTENMANN, 2010; VIRCHOW, 1858). Este tipo celular apresenta a expressão de filamentos intermediários como GFAP e vimentina (VIM) (VOLTERRA; MELDOLESI, 2005). No século XIX, os astrócitos foram divididos em protoplasmáticos e fibrosos. Os protoplasmáticos foram identificados na substância cinzenta e apresentam prolongamentos curtos, mais ramificados e largos. Os

fibrosos, encontram-se na substância branca, com prolongamentos finos, longos e menos ramificados (MATYASH; KETTENMANN, 2010). Dentro de uma mesma região cerebral, diversos tipos de astrócitos podem coexistir e, além disso, a densidade celular pode variar, sendo menor no centro do núcleo accumbens e maior na zona subventricular (EMSLEY; MACKLIS, 2006).

Por muitos anos, os astrócitos pareciam exercer um papel limitado de apoio aos neurônios, no entanto, atualmente sabe-se que eles têm um papel importante em todos os aspectos da função cerebral (RODNIGHT; GOTTFRIED, 2013). Eles são o componente celular chave das sinapses, atuando na transmissão e força sináptica, liberando fatores que influenciam o número das mesmas (VLACHOS *et al.*, 2012). Alguns autores demonstraram uma comunicação bidirecional entre neurônios e astrócitos e propuseram o termo “sinapse tripartite” indicando que estas células seriam o terceiro elemento na sinapse (ARAQUE *et al.*, 1999; HALASSA *et al.*, 2007). Os astrócitos modulam a função sináptica através da captação de potássio liberado pelos neurônios no potencial de ação e através da captação de glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA) da fenda sináptica (ANDERSON; SWANSON, 2000). A importância deles para a sinapse pode ser comprovada *in vitro*, nas culturas de neurônios, onde a adição de astrócitos ou de meio de cultura utilizados pelos astrócitos, leva a um aumento no número de sinapses excitatórias. Por outro lado, a retirada dos astrócitos ou do meio de cultivo utilizado por eles, leva a uma redução no número de sinapses funcionais formadas na cultura neuronal (ULLIAN *et al.*, 2012).

Estas células constituem o componente glial mais abundante no encéfalo de mamíferos, compreendendo de 20 a 40% do total de células do cérebro, e dispõem-se intimamente entre os neurônios no espaço intersticial, intermediando o contato das células nervosas com os vasos do tecido cerebral. Esta interface compõe a barreira hematoencefálica por meio dos pés vasculares, que são projeções astrócitárias que apresentam uma íntima associação com as arteríolas, vênulas e capilares do SNC, sendo capazes de liberar substâncias e íons diversos, que terão influência sobre os vasos, causando vasodilatação ou vasoconstrição (AKDEMIR; HUANG, A. Y.; DENEEN, 2020; TURNER; ADAMSON, 2011).

A expressão dos receptores de glutamato do tipo alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionico (AMPA) é considerado uma propriedade geral dos astrócitos e a expressão de transportadores de glutamato por estas células, controlam a

neurotransmissão excitatória e previnem a excitotoxicidade mediada por este neurotransmissor (MATYASH; KETTENMANN, 2010). Além das funções mencionadas acima os astrócitos controlam a neurogênese, produzem compostos antioxidantes como glutathiona (GSH) e SOD, e fatores de crescimento que aumentam a viabilidade celular (CABEZAS *et al.*, 2016; RODNIGHT; GOTTFRIED, 2013). Essas células são capazes de liberar substâncias neuroativas chamadas gliotransmissores (ATP, glutamato, GABA, D-serina e prostaglandina-E2) (RODNIGHT; GOTTFRIED, 2013). A liberação dos gliotransmissores ocorre na escala de tempo de milissegundos, integrando e processando informações sinápticas e, dessa forma, modulando a transmissão sináptica e a plasticidade (NAVARRETE *et al.*, 2013). A liberação de neurotransmissores pelos neurônios são percebidas pelos astrócitos que respondem com aumento de cálcio intracelular e subsequente liberação de gliotransmissores (PAIXÃO; KLEIN, 2010). A liberação de glutamina pelos astrócitos é crítica para a liberação de glutamato pelos neurônios (LANGE *et al.*, 2012).

As duas maiores proteínas de filamento intermediário dos astrócitos são a vimentina e GFAP (BRAMANTI *et al.*, 2010). Durante o desenvolvimento, os astrócitos imaturos expressam principalmente a vimentina. No final da gestação, a vimentina é progressivamente substituída por GFAP em células astrocíticas diferenciadas (GOMES, F. C.A.; PAULIN; NETO, 1999). Em resposta a um insulto ao sistema nervoso, ocorre um aumento das células astrocíticas chamada de gliose reativa (astrogliose) que é uma intensa proliferação destas células e uma expressão aumentada de GFAP. Esses astrócitos reativos demarcam o local da lesão formando uma cicatriz glial, fato este que acaba inibindo a regeneração axonal (SCHILDGE *et al.*, 2013). O fato das “cicatrices gliais” serem frequentemente observadas em diversas patologias do sistema nervoso, associa as células astrocíticas não apenas ao desenvolvimento fisiológico, mas também ao desenvolvimento de doenças neurológicas (BRAMANTI *et al.*, 2010).

Os astrócitos são importante fonte de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF), fator de crescimento do nervo (NGF) e outros fatores de crescimento com potenciais funções neuroprotetoras (CABEZAS *et al.*, 2016; RAMASWAMY; KORDOWER, 2009). As ações do BDNF são mediadas pelos receptores TrkB e P75^{NTR}, tendo mais afinidade pelo primeiro. Os astrócitos expressam exclusivamente um tipo de receptor TrkB que

não possui o domínio intracelular de tirosina-quinase (ISHII; WARABI; MANN, 2018). Uma das ações do BDNF sobre os astrócitos é a regulação da morfologia celular, induzindo o alongamento dos processos celulares, aumentando a área de contato com as sinapses neuronais (OHIRA *et al.*, 2007).

As múltiplas maneiras como os astrócitos influenciam a saúde e manutenção do SNC são amplamente apreciadas, tornando estas células um alvo atraente para a intervenção terapêutica (CLARKE *et al.*, 2017). Descobrir maneiras de modular a resposta dos astrócitos para melhorar funções neuroprotetoras e minimizar os efeitos inibitórios do crescimento, poderia ser muito benéfico para facilitar o reparo e a recuperação após lesão (CULLEN; YOUNG, 2016). Podemos perceber que os astrócitos são células regulatórias importantes dentro do SNC e, provavelmente, são mediadores críticos de alterações cerebrais induzidas pela TMS. Desta maneira, escolhemos observar as reações desta importante célula do SNC ao estímulo magnético estático moderado utilizando cultura primária, modelo que se supõem ser mais próximo das condições fisiológicas quando comparado às células diferenciadas obtidas nas linhagens celulares (HAGHIGHAT; MCCANDLESS; GERAMINEGAD, 2000; SHRODE-LD; PUTNAM-RW, 1994).

3.1.2 Cultura de astrócitos

Dado o papel fundamental do astrócitos no funcionamento do SNC, o desenvolvimento de métodos confiáveis para isolar e manter populações purificadas de células, como a cultura primária, demonstra-se uma ótima ferramenta para o estudo e compreensão desta célula. Muitas de suas funções foram identificadas usando esta preparação de cultura de tecido e, após, confirmadas com estudos *in vivo* (LANGE *et al.*, 2012; SCHILDGE *et al.*, 2013).

Os astrócitos oriundos de cultivo primário encontram-se em monocamada inibida por contato, criando células com morfologia plana, poligonal e epitelióide sem contato sináptico e elementos vasculares. Deve-se ter em mente que, embora reflitam muitas características dos astrócitos, eles também diferem destas células *in vivo* (LANGE *et al.*, 2012; RODNIGHT; GOTTFRIED, 2013). Os astrócitos devem ser cultivados em condições que mimetizem ao máximo o ambiente fisiológico, pois isso aumentará a validade dos resultados obtidos. Os protocolos usados devem criar um ambiente ideal para proliferação e maturação, além de minimizar o potencial de proliferação de células contaminantes. A composição do meio de cultura é de suma

importância pois afeta a pureza da cultura, expressão gênica e resposta astrocitária (LANGE *et al.*, 2012; SCHILDGE *et al.*, 2013).

Uma vantagem do uso do astrócito em cultivo primário é a ausência de outros tipos celulares, podendo-se observar separadamente e detalhadamente a função destas células. Uma cultura formada puramente por astrócitos é conseguida através de vários cuidados no momento do cultivo, como dissociação mecânica adequada, tipo de revestimento da placa de cultura e o processo de agitação realizado em vários momentos durante o cultivo (FUNCHAL; DANI, 2014; LANGE *et al.*, 2012; SCHILDGE *et al.*, 2013). A estimativa da pureza da cultura é de fundamental importância para poder relacionar os achados a uma resposta puramente astrocitária, e pode ser demonstrada pela porcentagem de células GFAP+. O GFAP pode estar mais expresso também quando há um aumento na reatividade astrocitária (astroglíose). Conforme Lange, a cultura primária de astrócito pode ser usada como um modelo confiável para estudar as funções astrocíticas básicas relacionadas aos processos metabólicos no cérebro (LANGE *et al.*, 2012).

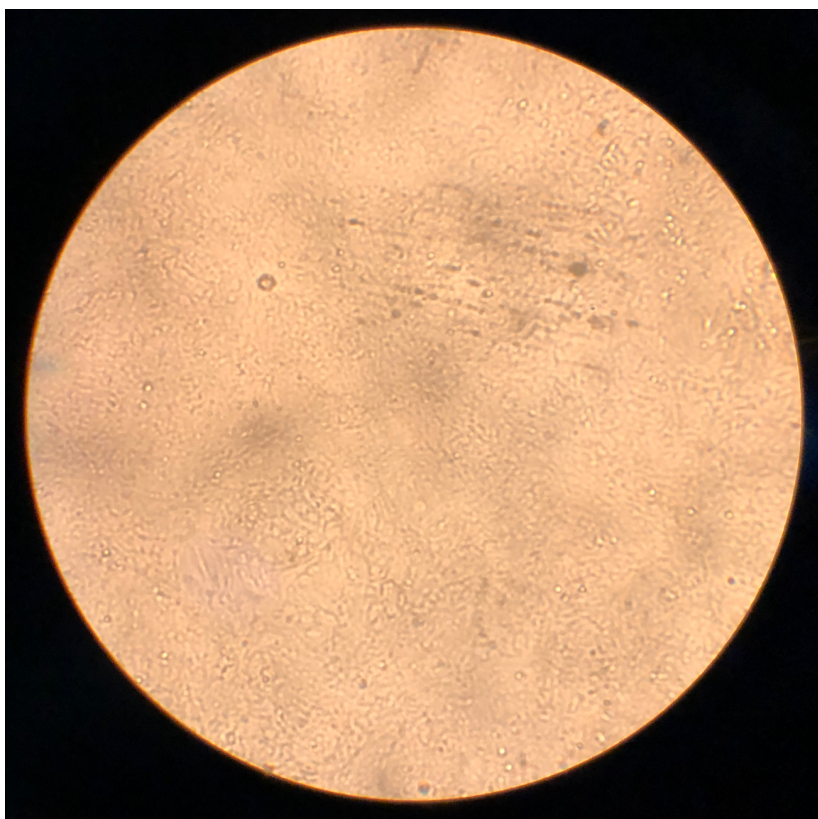


Figura 2: Cultura primária de astrócitos obtidas de córtex cerebral de ratos

3.2 Estimulação Magnética

O uso de estimulação cerebral, para tratamento de doenças, data de muito tempo. Já na era “pré-elétrica” (43-48 d.C.) tem-se relato da aplicação de descargas elétricas do “peixe torpedo” para alívio de dores de cabeça. Apesar destes relatos, a investigação do uso terapêutico da estimulação cerebral foi impulsionada após a descoberta do eletromagnetismo, que geraram métodos para a manipulação de correntes elétricas. O primeiro pesquisador a avaliar os efeitos do eletromagnetismo sobre o SNC, o médico e físico D’Arsonval, escreveu, ao final do trabalho realizado em 1896 e intitulado “Aparelho para medir correntes alternadas de todas as frequências”, que “um campo magnético alternante com uma intensidade de 110 volts, 30 amperes e com uma frequência de 30 ciclos por segundo, quando se coloca a cabeça dentro da bobina, fosfenos e vertigens e, em algumas pessoas, síncope “ (FREGNI; BOGGIO; BRUNONI, A., 2012). Em meados do século XX, alguns métodos de estimulação cerebral como a eletroconvulsoterapia e a estimulação cerebral transcraniana por corrente contínua (ETCC) e alternada começaram a ser estudadas, porém foram ofuscadas pelo avanço da psicofarmacologia. Entre 1970 e 2000, o desenvolvimento da estimulação magnética transcraniana (EMT) foi o avanço mais importante. O desenvolvimento e a aplicação biomédica de um aparelho capaz de modificar a atividade cerebral por meio de indução eletromagnética só foram elaborados e publicados em 1985 (BARKER; JALINOUS; FREESTON, 1985; FREGNI; BOGGIO; BRUNONI, A., 2012).

Atualmente, a busca por terapêuticas não invasivas que possam melhorar o curso de doenças neurológicas e psiquiátricas têm mostrado muitos avanços nessa área e os pesquisadores esforçam-se para desenvolver ferramentas com menor risco e maior benefício para o paciente (NOOHI; AMIRSALARI, 2016). A partir destes esforços foram desenvolvidos vários métodos de estimulação cerebral.

Os campos magnéticos, de uma maneira geral, podem ser categorizados em campo magnético estático (CME) e campo magnético dinâmico (CMD), dependendo se a intensidade e a direção do campo mudam ao longo do tempo (ZHANG, L. *et al.*, 2016). Existem duas unidades de medida de intensidade de campo magnético, Gauss (G) e Tesla (T) ($1T = 10^4G$) (COLBERT; SOUDER; MARKOV, 2009) e o estímulo magnético pode ser classificado como fraco (<1mT), moderado (1mT a 1T), forte (1T a 5T) e ultra forte (>5T) (ROSEN, 2003). Essas intensidades de estímulos

podem resultar em diferentes respostas no SNC quando submetido aos campos magnéticos.

3.2.1 Estimulação Magnética Transcraniana

A EMT é um método não invasivo de estimulação cerebral que tem sido bastante empregado como tratamento complementar de várias patologias neurológicas e psiquiátricas (Figura 2) (FREGNI; BOGGIO; BRUNONI, A., 2012). Além do uso terapêutico a EMT é muito utilizada como ferramenta diagnóstica onde avalia integridade de vias nervosas. Em geral, a EMT é considerada segura e sem efeitos colaterais duradouros. A possibilidade de induzir convulsão é a principal preocupação em relação a segurança desta técnica. As crises convulsivas foram relatadas em um pequeno número de pacientes durante a estimulação, sem o relato de recorrência. A cefaleia é o efeito colateral mais comum. Não foram relatadas sequelas neurológicas, cognitivas ou cardiovasculares duradouras (GEORGE; ASTON-JONES, 2010). Segundo Manzetti, a exposição prolongada e sistemática a estímulo magnético de fraca a média intensidade, como exposição ambiental, por meses a anos, pode causar vertigens, sonolência, cefaleia, fadiga entre outros (MANZETTI; JOHANSSON, 2012). Sua principal desvantagem está relacionada ao valor do aparelho que, por precisar de grande aparato, eleva bastante seu custo.

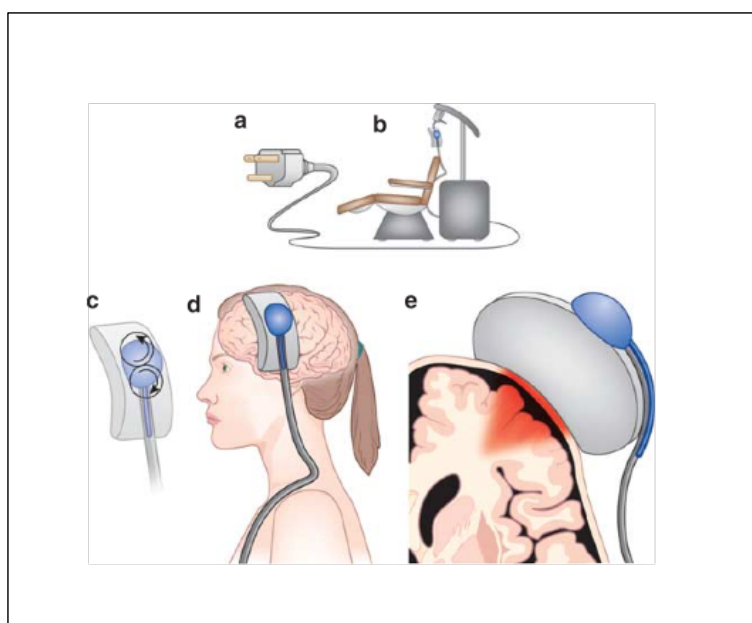


Figura 3: Modelo de estimulador magnético transcraniano. Fonte: (GEORGE; ASTON-JONES, 2010).

A estimulação magnética transcraniana repetitiva (rTMS) utiliza pulsos magnéticos sobre o crânio para induzir corrente elétrica (CLARKE *et al.*, 2017). É fornecida em intensidades entre 1–2T, medidas na superfície da bobina (DENG; LISANBY; PETERCHEV, 2013). Na EMT, quando se utiliza frequências menores que 1Hz, ocorre um efeito inibitório sobre os neurônios, provavelmente porque a baixa frequência estimula seletivamente os neurônios inibitórios GABA, ocasionando uma condição eletrofisiológica denominada depressão de longa duração que seria a diminuição prolongada na força sináptica (FREGNI; BOGGIO; BRUNONI, A., 2012; HOFFMAN; CAVUS; PH, 2002). Por outro lado, a estimulação de alta frequência (>3Hz) geralmente resulta em facilitação da despolarização da membrana celular neuronal e, conseqüentemente, excitação celular (BRUNONI, A. R. *et al.*, 2013; GEORGE; ASTON-JONES, 2010; HOUDAYER *et al.*, 2008; HUANG, Y. Z. *et al.*, 2005; MA *et al.*, 2013). Ao realizar a estimulação magnética em determinada área do crânio, é produzido um campo focal que atua diretamente sobre as células subjacentes e sua ação se propaga, visto que estas células modulam atividades em centros neurais distantes. Além disso, ao redor das células que recebem o estímulo principal, há a chegada de campo magnético mais fraco atuando em grande volume de tecido cortical e sub-cortical adjacente (FATEMI-ARDEKANI, 2008; THIELSCHER; KAMMER, 2004).

A EMT tem se mostrado um efetivo método para uso tanto em pesquisa básica em neurociência quanto para tratamento clínico (MINIUSSI; ROSSINI, 2011). É uma técnica que vem sendo utilizada como tratamento complementar em distúrbios neurológicos como depressão, doença de Parkinson, esclerose múltipla, demência, acidente vascular cerebral (AVC), dor crônica entre outras (RIDDING; ROTHWELL, 2007; STOCK *et al.*, 2012). Apesar do crescente uso, seu mecanismo de ação sobre o córtex cerebral permanece pouco claro e os efeitos experimentados pelos pacientes provavelmente incluem a ativação de outros tipos celulares além dos neurônios. Devido ao papel crítico e variado das células da glia no funcionamento do SNC, a influência da EMT sobre estas células é uma área que merece interesse e entendimento (CULLEN; YOUNG, 2016).

3.2.1.1- Estimulação magnética dinâmica em culturas celulares

Não há muitos estudos, até o momento, que demonstrem a influência da estimulação magnética em cultura primária de células do sistema nervoso. O que foi demonstrado por alguns autores é que estímulos de alta intensidade podem reduzir a sobrevivência e aumentar a apoptose em cultura celular, enquanto estímulos de baixa intensidade podem melhorar a atividade sináptica e promover rápido crescimento e desenvolvimento neuronal (MA *et al.*, 2013; SAITO *et al.*, 2009). Clark e colaboradores, observaram os efeitos da estimulação magnética repetida (rMS) em cultura de astrócitos e concluíram que esse estímulo influenciou fisiologicamente no aumento de cálcio intracelular, tanto citoplasmático quanto intranuclear (CLARKE *et al.*, 2017). Segundo alguns autores, a EM aumenta os níveis de BDNF no córtex e hipocampo de ratos estimulados e induz a liberação desse fator neurotrófico em cultura de neurônios hipocámpais e de neuroblastoma (LEE, J. Y. *et al.*, 2015; MULLER *et al.*, 2000; WATERHOUSE; XU, B., 2009). Alguns pesquisadores sugerem que o campo eletromagnético modularia o comportamento das células neurais pela variação do potencial de ação da rede neural, ou pela estimulação de fatores de crescimento. Outros supõem que mecanismos celulares não neurais estariam influenciando sua ação (AARON *et al.*, 2004; MEYER; WOLF; GROSS, 2009). Segundo Cullen, o efeito terapêutico é atribuído a sua capacidade de diminuir a hiperexcitabilidade neuronal, diminuir a neuroinflamação, alterar a permeabilidade da barreira hematoencefálica e promover a sobrevivência neuronal. (CULLEN; YOUNG, 2016). A estimulação magnética pulsada em astrócitos cultivados induziu um aumento transitório de GFAP que durou 3 dias (CHAN *et al.*, 1999). O rTMS tem demonstrado induzir um aumento transitório na expressão do GFAP *in vivo*, quando o tratamento foi aplicado após uma injúria isquêmica em ratos (50Hz, 0,5mT por 7 dias) ou em lesão desmielinizante (FANG, Z. *et al.*, 2010; RAUS *et al.*, 2013). Ao contrário, a rTMS pareceu atenuar a ativação astrocitária em ratos com lesão na medula espinhal, com redução de cerca de 30% na expressão de GFAP quando comparado ao controle (KIM, J. Y. *et al.*, 2013). A astrogliose, que é uma reação astrocitária a um dano de qualquer natureza, é frequentemente acompanhada de mudanças morfológicas nos astrócitos. Essas alterações foram observadas após a estimulação por corrente contínua em cultura astrocitária (PELLETIER *et al.*, 2015), mas não foi observada em estimulação magnética (CHAN *et al.*, 1999). Esses dados indicam que a estimulação magnética pode afetar os astrócitos, mas é um efeito que

dependente de parâmetros de intensidade e tempo de estímulo (CULLEN; YOUNG, 2016).

3.2.2 Estimulação magnética estática

A estimulação magnética estática (EME), que foi o objeto de nosso estudo, tem gerado grande interesse nos últimos anos, devido a grande variedade de efeitos biológicos relatados tanto em experimentos pré-clínicos como em estudos clínicos. A EME é produzida por magnetos que não produzem campos alternantes e não induzem qualquer aumento de temperatura, diferente da EMT (CHIONNA *et al.*, 2003). Para gerar um campo magnético estático são utilizados ímãs e, para aplicação clínica, três tipos são os mais utilizados: o flexível emborrachado, ferrita cerâmica e neodímio. Os ímãs de neodímio, por ter uma alta intensidade por unidade de volume, tem sido utilizado com sucesso para aplicação em áreas onde se deseja que a penetração do campo seja profunda (COLBERT; SOUDER; MARKOV, 2009).

No SNC os efeitos do campo magnético estático têm sido muito observados pois estes campos influenciam os sistemas biológicos onde a função depende das propriedades das membranas excitáveis. A EME parece afetar numerosas funções como inibição do potencial de ação da sensibilidade nociceptiva, alteração na expressão genética, morfologia e orientação celular, e promoção da proliferação das células progenitoras neuronais (NAKAMICHI *et al.*, 2009; ROSEN, 2003; YAKIR-BLUMKIN, BEN *et al.*, 2014). Prina-Mello em 2006 relatou que exposição a campo magnético estático ativa a abertura dos canais de cálcio voltagem dependente em neurônios corticais de ratos (PRINA-MELLO *et al.*, 2006). Há numerosos estudos avaliando o efeito da EME em tipos celulares diversos, mas poucos avaliando seus efeitos especificamente em cultura de células do sistema nervoso (LAHBIB, Aïda *et al.*, 2014; NAKAMICHI *et al.*, 2009; ROSEN, 2003; YAKIR-BLUMKIN, BEN *et al.*, 2014). Em 2005, Bodega e colaboradores avaliaram os efeitos da EME e sinusoidal (1mT / 50Hz) durante 1h, 2h, 4h e 11 dias, em cultura de astrócitos, e não observaram diferenças entre controle e estimulados em relação aos parâmetros avaliados (GFAP, hsp25, hsp60, hsp70, actina) (BODEGA *et al.*, 2005).

3.2.2.1 Estimulação magnética estática e viabilidade celular

A informação de como a EME influenciaria a viabilidade celular é uma preocupação recorrente entre os autores. Alguns pesquisadores observaram um aumento gradual na necrose e apoptose de astrócitos após exposição a EME de 0,5mT por 6 dias e, uma redução de células neuronais após estimulação de 17T por 30min a 1h (BUEMI; DI; FLOCCARI, 2001; VALIRON *et al.*, 2005). Outros, não encontraram diferença na viabilidade celular nem na morfologia de astrócitos da medula espinhal expostos a alta intensidade de campo magnético (KHODARAHMI; MOBASHERI; FIROUZI, 2010). Foi evidenciado também uma redução na viabilidade celular em células tumorais (glioblastoma) após 48h de exposição a campo magnético de média intensidade e uma redução no crescimento celular de melanoma (KIM, S. C. *et al.*, 2016; SULLIVAN; BALIN; ALLEN, 2011).

3.2.2.2 Estimulação magnética estática e estresse oxidativo

A EME parece também causar mudanças nas atividades enzimáticas, alterar estrutura e função da membrana e induzir dano no DNA. Além disso, alguns estudos tem sugerido que ela induz a produção de espécies reativas de oxigênio em diferentes células e organismos através de uma indução pró-inflamatória (GHODBANE *et al.*, 2013). A exposição a EME de 128mT 1h/dia, durante 5 dias consecutivos, aumentou a atividade da enzima CAT em fígado, mas não em cérebro, de ratos. Entretanto, o mesmo tratamento não causou alterações na concentração de malondialdeído (MDA) no cérebro e fígado dos animais (GHODBANE *et al.*, 2015). Após EME de 128mT 1h/dia durante 30 dias consecutivos houve uma redução na atividade da glutathiona peroxidase (GPx), CAT e SOD no córtex frontal. No hipocampo, a EME aumentou a concentração de MDA (AMARA *et al.*, 2009). A EME de 4,7T por 3, 6, 24 e 48h aumentou a peroxidação lipídica em fígado entretanto não ocorreu o mesmo com rins, encéfalo, coração e pulmões, permanecendo igual ao controle (WATANABE; NAKAGAWA; MIYAKOSHI, 1997). Houve um importante aumento na peroxidação lipídica em sinaptossomos de cérebros de ratos expostos a estimulação crônica (50 dias) de 1mT (DINČIĆ *et al.*, 2018).

3.2.2.3 Estimulação magnética estática x ciclo celular e membrana celular

Alguns autores observaram alterações no ciclo celular após exposição a EME, como Mohammadi que percebeu uma retenção (aumento) da população celular em fase G1 em cultura de células de plantas e Sadri que evidenciou uma redução na população celular na fase G1 em célula tronco mesenquimais humanas (MOHAMMADI; GHANATI; SHARIFI, 2018; SADRI *et al.*, 2017).

Chiona em 2003, concluiu que a EME de 6mT por 5 dias em linfócitos humanos e células U937 não exerceu efeito tóxico, mas levou a modificações na forma celular, na estrutura da membrana plasmática e aumentou o nível de cálcio intracelular e que, portanto, a EME apresenta efeitos biológicos nas células estudadas (CHIONNA *et al.*, 2003). Paradisi (1993) concluiu que um campo magnético sinusoidal a 2,5mT pode alterar a estrutura da membrana plasmática sem modificar a capacidade proliferativa de células K562 (PARADISI *et al.*, 1993).

É possível observar que muitas especulações são levantadas sobre os mecanismos decorrentes dos efeitos de EM entretanto, dada a complexidade das estruturas do tecido, têm sido bastante difícil um completo entendimento dos mecanismos envolvidos, induzindo à dúvidas sobre as possíveis alterações bioquímicas e funcionais presentes em células submetidas à ação de campos magnéticos. Além disso, há poucos dados obtidos em relação a padrões de estimulação que otimizem respostas celulares específicas (COLBERT; SOUDER; MARKOV, 2009; CULLEN; YOUNG, 2016; MÜLLER-DAHLHAUS; VLACHOS, 2013; TANG; THICKBROOM; RODGER, 2015). Desta maneira, submetemos astrócitos obtidos de cultivo primários à EME de 305mT visando um melhor entendimento do mecanismo pelo qual a EME exerce suas ações nessas células.

4 Resultados

Os resultados que fazem parte do trabalho desenvolvido durante o período de doutorado estão apresentados sob a forma de um artigo e de um manuscrito. As seções sobre os materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas encontram-se nos respectivos artigos e representam a integralidade desse estudo.

As referências bibliográficas observadas no final da tese são referentes à introdução e revisão da literatura do corpo da tese.

O artigo e o manuscrito estão estruturados de acordo com as revistas as quais foram publicado e submetido, respectivamente: *Brazilian Journal of Development* (Artigo 1) e *Brain Stimulation* (Manuscrito 2).

4.1 Artigo 1 - Publicado no periódico, *Brazilian Journal of Development*

Análise morfológica e bioquímica de astrócitos em cultura primária sob estimulação magnética estática

Morphological and biochemical analysis of astrocytes in primary culture under static magnetic stimulation

Morphological and biochemical analysis of astrocytes in primary culture under static magnetic stimulation

Caroline Crespo Da Costa¹; Jéssica Obelar²; Eduarda Santa Helena³; Nathalia Stark Pedra⁴; Leo Anderson Meira Martins⁵; Paulo Roberto Stefani Sanches⁶; Giovana Duzzo Gamaro⁷; Izabel Cristina Custódio De Souza⁸

¹ *Universidade Federal de Pelotas – carolneuro@yahoo.com.br*

² *Universidade Federal do Rio Grande do Sul – jessicaobelar@gmail.com*

³ *Universidade Federal do Rio Grande – eduarda.shelena@hotmail.com*

⁴ *Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com*

⁵ *Universidade Federal do Rio Grande do Sul – leo.meira@ufrgs.br*

⁶ *Universidade Federal do Rio Grande do Sul – psanches@hcpa.edu.br*

⁷ *Universidade Federal de Pelotas – giovanagamaro@hotmail.com*

⁸ *Universidade Federal de Pelotas – belcustodio20@yahoo.com.br*

Resumo

A utilização da estimulação magnética cerebral vem crescendo na prática clínica, embora o mecanismo pelo qual atua nas células ainda precisa ser elucidado. Com o objetivo de avaliar respostas morfológicas e bioquímicas, submetemos astrócitos obtidos de córtex cerebral de ratos Wistar à estimulação magnética estática (EME) de 305mT por 5, 15 e 30 min diários durante 7 dias consecutivos. O estímulo magnético não afetou a morfologia astrocitária, mas ocasionou um aumento na sulforodamina B nas células estimuladas por 5 e 15 min, bem como, na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) apenas no tempo de 5 min diários comparados ao grupo controle. Em maiores tempos de estimulação como o de 30 min diários, não mostraram alterar nenhum dos parâmetros avaliados. Nossos resultados, embora preliminares, demonstram que em tempos menores de estimulação ocorre um aumento na densidade celular e EROs, sugerindo que com o aumento do tempo de estimulação os astrócitos possam adaptar-se ao insulto. Porém são necessários avaliação de outros parâmetros para suportar estes achados.

Palavras-chave

Estimulação Magnética Estática (EME), Astrócitos, Sulforodamina B, Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Abstract

The use of magnetic brain stimulation has been growing in clinical practice, although the mechanism by which it acts on cells has yet to be elucidated. In order to evaluate morphological and biochemical responses, we submitted astrocytes obtained from the cerebral cortex of Wistar rats to static magnetic stimulation (EME) of 305mT for 5, 15 and 30 min daily for 7 consecutive days. The magnetic stimulus did not affect the astrocyte morphology, but it caused an increase in sulforodamine B in the cells stimulated for 5 and 15 min, as well as, in the production of reactive oxygen species (ROS) only in the time of 5 min daily compared to the control group. In longer stimulation times, such as 30 min daily, they did not show to change any of the evaluated parameters. Our results, although preliminary, demonstrate that in shorter times of stimulation there is an increase in cell density and ROSs, suggesting that with the increase in stimulation time astrocytes may adapt to the insult. However, evaluation of other parameters is necessary to support these findings.

Key words

Static Magnetic Stimulation (EME), Astrocytes, Sulforodamine B, Reactive Oxygen Species (ROSs)

1. Introdução

A estimulação magnética cerebral vem sendo utilizada como adjuvante no tratamento de patologias neurológicas e psiquiátricas com a observação de alguns efeitos positivos relacionados a melhora destas patologias (CHEN, R. *et al.*, 2016; LEE, E. G. *et al.*, 2016). A utilização da estimulação magnética transcraniana (EMT) tem demonstrado benefícios em diversos estudos já descritos na literatura. Apesar da sua utilização em modelos pré-clínicos e em ensaios clínicos, pouco se sabe a respeito do mecanismo pelo qual a EMT atua em nível celular no sistema nervoso central (SNC) (FREGNI; BOGGIO; BRUNONI, A., 2012).

Sabe-se que a estimulação magnética estática é capaz de reduzir a excitabilidade cortical, alterando a função de canais iônicos de membrana devido as propriedades bioquímicas dos fosfolípidios. Por esta razão, é importante elucidar os possíveis efeitos diretos dessa terapêutica sobre células neurais e compreender seu mecanismo de ação sobre o metabolismo, tanto em células sob condições patológicas quanto em células saudáveis, pois todas são expostas aos estímulos magnéticos durante um possível tratamento (CHWISTEK, 2017; LOZANO-SOTO *et al.*, 2018).

Muitos trabalhos *in vitro* utilizam astrócitos pois são células em maior proporção que os neurônios no tecido cerebral (BASS *et al.*, 1971). Os astrócitos possuem várias funções biológicas dentro das quais podemos citar o suporte estrutural e metabólico para neurônios (BARRETO, R. A. . *et al.*, 2006) e o auxílio na migração dos axônios em desenvolvimento e na transmissão sináptica. Além disso, os astrócitos compõem a barreira hematoencefálica e regulam o tônus cerebrovascular (GOMES, Flávia Carvalho Alcantara; TORTELLI; DINIZ, 2013). Outra função importantíssima dos astrócitos é exercida durante o dano cerebral e as condições patológicas, em que estas células se tornam reativas e apresentam um aumento da expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (SCHILDGE *et al.*, 2013). Estudos prévios têm demonstrado que a ausência dessa proteína está relacionada com possíveis modificações no citoesqueleto (MENET *et al.*, 2001) que podem estar relacionadas a alterações nas propriedades da membrana plasmática.

Considerando a importância desta célula para o funcionamento do sistema nervoso, o objetivo do presente trabalho, foi avaliar os efeitos da estimulação

magnética estática em cultura de astrócitos, avaliando aspectos morfológicos e bioquímicos.

2. Metodologia

2.1 Cultura de células:

Foram realizadas culturas primárias de astrócitos obtidos do córtex cerebral de ratos Wistar com 1 dia de vida, baseado no protocolo descrito por Schildge *et al* e Funchal *et al* (FUNCHAL; DANI, 2014; SCHILDGE *et al.*, 2013). Após semeadas em placas de 24 poços (70.000 céls/poço), as células foram incubadas a 37°C e 5%CO₂, com meio de cultivo (DMEM *low glucose*, Sigma, ref, D5523), que foi trocado em intervalos de 3 a 4 dias até atingirem a confluência.

2.2 Estimulação Magnética Estática

Após atingirem a confluência, cerca de 18 dias após o início do cultivo, as células foram divididas em 4 grupos: grupo controle (C) que não recebeu estimulação magnética e os grupos que receberam a estimulação magnética diária, durante 7 dias consecutivos, por 5 min (grupo 5), 15 min (grupo 15) e 30 min (grupo 30). Para aplicação das estimulações magnéticas, foi utilizado um dispositivo projetado pela Bioengenharia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), que consiste em uma placa com ímãs de NeFeB (neodímio-ferro-boro) que permite acoplar uma placa de 24 poços. Cada placa continha seis ímãs espaçados entre si para evitar a interação entre as fontes de campo magnético. O campo magnético do dispositivo apresentava 305mT de força, mensurada por meio de um Gaussmeter Hall Effect (Teslameter Kashava 5, Wuntronic GmbH, Alemanha).

2.3 Avaliação Morfológica

No decorrer do período de tratamento, as células foram avaliadas diariamente em microscópio de luz invertido e as imagens foram captadas através de registro fotográfico.

2.4 Ensaio para Sulforadamina B

Após o último dia de estimulação das células, o conteúdo proteico celular total foi avaliado por meio do ensaio colorimétrico sulforadamina B (SRB) (CHAN *et al.*,

1999; PAUWELS *et al.*, 2003). As células foram lavadas com salina tampão fosfato (PBS) e fixadas com ácido tricloroacético por 30 min a 4°C. Após foram lavadas com água destilada, coradas com 0,4% sulforodamina B por 45 min e lavadas com ácido acético. As células secaram a temperatura ambiente e então o complexo proteico formado foi solubilizado em 10 mM tampão Tris. A partir disso foi realizada a leitura das amostras, por meio de um leitor de microplaca (SpectraMax 190) a uma absorvância de 540 nm. Os dados foram expressos em porcentagem tendo como referência o controle.

2.5 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

A determinação da concentração de EROs foi realizada baseado no protocolo de Ferreira-Cravo *et al.*, com modificações (FERREIRA-CRAVO *et al.*, 2007). Brevemente, as células foram incubadas com diacetato de 20,70 diclorofluoresceína (H2DCF-DA, 40nM) a 37° C por 30 min em PBS. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e alíquotas de 160µl foram colocadas em triplicata em uma placa de 96 poços. Em seguida, a intensidade da fluorescência, representativo da concentração de EROs, foi medida durante 90 min a 37° C no fluorômetro Victor 2 (Perkin-Elmer), usando comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão 520 nm. Os níveis de ROS foram expressos em termos de área de fluorescência em um polinômio de segunda ordem e a integração entre 0 e 90 min, a fim de obter sua área.

2.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Os efeitos da estimulação magnética estática sobre a cultura de astrócitos em relação a Sulforodamina B e EROs foi realizada usando ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* Tukey para múltiplas comparações. Os dados foram analisados usando o programa estatístico GraphPad Prism (versão 8, GraphPad software, CA, USA).

3. Resultados e Discussão

Neste estudo, é fundamental ressaltar que nossos experimentos utilizaram astrócitos obtidos de cultura primária de córtex, e que estas células apresentam

inúmeras funções para o controle homeostático (HAIM, BEN; ROWITCH, 2016; VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018). A análise da morfologia celular foi obtida por meio de imagens das culturas de células durante os 7 dias de estimulação e em todos os tempos (Figura 1). Não foi possível evidenciar diferenças entre os grupos expostos à estimulação magnética estática em comparação ao grupo controle, nem nos grupos estimulados entre si. Portanto, as células parecem se desenvolver de forma semelhante em relação a sua morfologia.

No entanto, foi possível observar por meio do ensaio com sulforodamina B, um aumento no conteúdo proteico nos grupos submetidos à estimulação magnética estática por 5 e 15 minutos, quando comparados ao controle ($p = 0,025$ e $p < 0,001$, respectivamente; Figura 2). Alguns autores associam o ensaio da sulforodamina B com densidade celular; neste sentido, poderíamos interpretar esse resultado desta forma (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). É importante ressaltar o papel dos astrócitos na função e na proteção do cérebro. Neste sentido, a astrogliose, caracterizada pela hiperplasia e hipertrofia de astrócitos, tem sido amplamente descrita como um mecanismo crucial na resposta a danos de qualquer natureza (ENG, Lawrence F; GHIRNIKAR; LEE, Yuen L, 2000). Assim, um aumento na densidade de células poderia estar associado a uma hiperplasia astrocitária em resposta a um dano ou insulto celular com intuito de manter a homeostase do cérebro. A sulforodamina B é um método colorimétrico que detecta proteínas celulares e, portanto, não depende de uma reação metabólica celular, *i.e.* não depende da funcionalidade celular (BANASIAK *et al.*, 1999; FACCI; SKAPER, 2019; PAUWELS *et al.*, 2003; RUBINSTEIN *et al.*, 1990). Assim, a quantidade de corante extraída das células é diretamente proporcional a massa celular (FACCI; SKAPER, 2019). Desta forma, ainda que nossos resultados sugiram um aumento na densidade celular, outros métodos serão necessários para contrapor ou confirmar o encontrado neste ensaio (KEEPERS *et al.*, 1991; PAUWELS *et al.*, 2003).

Ainda, no grupo estimulado por 5 min, ocorreu um aumento de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$). No entanto, não foram observadas diferenças significativas nos demais tempos. A estimulação magnética estática pode modular os sistemas biológicos por meio da ativação de diferentes moléculas, vários trabalhos mostram que pode alterar morfologia, proteínas de citoesqueleto e de membrana plasmática, bem como, morte ou sobrevivência celular (SULLIVAN; BALIN; ALLEN, 2011; TEODORI *et al.*, 2006;

ZHANG, L. *et al.*, 2017; ZHAO, G. *et al.*, 2011). Estudos mostram que a produção de espécies reativas de oxigênio pode aumentar em células submetidas a um campo magnético. No entanto, o prosseguimento desta exposição por um período maior reverte este aumento na produção de EROs, corroborando nossos resultados (SULLIVAN; BALIN; ALLEN, 2011). As respostas encontradas em muitos estudos são variadas e dependem do tipo celular estudado e da intensidade da estimulação magnética aplicada, seja estática ou não (SIMKO, 2007; TIAN *et al.*, 2018). No presente estudo, as alterações observadas ocorreram apenas nos menores tempos, o que nos faz pensar que, depois de um determinado tempo de estimulação, ocorra uma adaptação celular com o intuito de manter a homeostase tecidual (CALABRESE; MATTSON, 2017).

4. Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo são preliminares e sugerem que, após um período de 7 dias de estímulo magnético estático, não ocorrem alterações morfológicas em astrócitos. Porém, a partir do ensaio da sulforadamina B, foi observado um possível aumento na densidade celular nos tempos de 5 e 15 minutos de estimulação magnética estática. É importante ressaltar que apenas no tempo de 5 minutos ocorreu aumento na produção de EROs, sugerindo uma alteração no metabolismo celular. O mesmo não ocorreu nos maiores tempos de estimulação, o que pode estar relacionado a uma possível capacidade adaptativa da célula ao insulto. Desta forma, existe a necessidade da realização de mais estudos buscando elucidar os efeitos da estimulação magnética estática sobre a funcionalidade destas células em relação a outros parâmetros. Assim, busca-se a partir do exposto, respostas para entendermos os mecanismos subjacentes a estes estímulos.

Referências:

- BANASIAK, D. *et al.* Comparison between the clonogenic, MTT, and SRB assays for determining radiosensitivity in a panel of human bladder cancer cell lines and a ureteral cell line. **Radiation Oncology Investigations**, 1999. v. 7, n. 2, p. 77–85.
- BARRETO, R. A. . *et al.* O alcalóide monocrotalina , extraído de *Crotalaria retusa* , altera a expressão de GFAP , a morfologia e o crescimento de culturas primárias de astrócitos . **Revista Brasileira de Saúde**, 2006. v. 7, n. 2, p. 112–127. Disponível em: <<http://www.rbspa.ufba.br>>.
- BASS, N. H. *et al.* Quantitative cytoarchitectonic distribution of neurons, glia, and DNA in rat cerebral cortex. **Journal of Comparative Neurology**, 1971. v. 143, n. 4, p. 481–490.
- CALABRESE, E. J.; MATTSON, M. P. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? **npj Aging and Mechanisms of Disease**, 2017. v. 3, n. 1, p. 1–8.
- CHAN, P. *et al.* Effects of pulsed magnetic stimulation of GFAP levels in cultured astrocytes. **J Neurosci Res**, 1999. v. 55, n. 2, p. 238–244. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9972826>.
- CHEN, R. *et al.* Transcranial magnetic stimulation for the treatment of epilepsy (Review) SUMMARY OF FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON. 2016. n. 8.
- CHWISTEK, M. Recent advances in understanding and managing cancer pain. **F1000Research**, 2017. v. 6, n. 0, p. 1–10.
- ENG, Lawrence F; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Yuen L. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP- Thirty-One Years (1969 – 2000) *. **Neurochemical Research**, 2000. v. 25, p. 1439–1451.
- FACCI, L.; SKAPER, S. **Neurotrophic Factors: Methods and Protocols**. [S.l.]: [s.n.], 2019. V. 1727.
- FERREIRA-CRAVO, M. *et al.* Antioxidant responses and reactive oxygen species generation in different body regions of the estuarine polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae). **Chemosphere**, 2007. v. 66, n. 7, p. 1367–1374.
- 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.

FUNCHAL, C.; DANI, C. **Neurociências: Modelos experimentais em animais**. Porto Alegre: Editora Universitária Metodista IPA: EDIPUCRS, 2014.

GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L. Glia: Dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avancados**, 2013. v. 27, n. 77, p. 61–84.

HAIM, L. BEN; ROWITCH, D. H. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. **Nature Reviews Neuroscience**, 2016. v. 18, n. 1, p. 31–41.

KEEPERS, Y. P. *et al.* Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, 1991. v. 27, n. 7, p. 897–900.

LEE, E. G. *et al.* Investigational Effect of Brain-Scalp Distance on the Efficacy of Transcranial Magnetic Stimulation Treatment in Depression. **IEEE Transactions on Magnetism**, 2016. v. 52, n. 7, p. 10–13.

LOZANO-SOTO, E. *et al.* Transcranial static magnetic field stimulation (tSMS) of the visual cortex decreases experimental photophobia. **Cephalalgia**, 2018. v. 38, n. 8, p. 1493–1497.

MENET, V. *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. **Journal of Neuroscience**, 2001. v. 21, n. 16, p. 6147–6158.

PAUWELS, B. *et al.* Comparison of the sulforhodamine B assay and the clonogenic assay for in vitro chemoradiation studies. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 2003. v. 51, n. 3, p. 221–226.

RUBINSTEIN, L. V. *et al.* Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, 1990. v. 82, n. 13, p. 1113–1117.

SCHILDGE, S. *et al.* Isolation and Culture of Mouse Cortical Astrocytes. **Journal of Visualized Experiments**, 2013. n. 71, p. 1–7. Disponível em:
<<http://www.jove.com/video/50079/isolation-and-culture-of-mouse-cortical->

astrocytes>.

SIMKO, M. Cell Type Specific Redox Status is Responsible for Diverse Electromagnetic Field Effects. **Current Medicinal Chemistry**, 2007. v. 14, n. 10, p. 1141–1152.

SULLIVAN, K.; BALIN, A. K.; ALLEN, R. G. Effects of static magnetic fields on the growth of various types of human cells. **Bioelectromagnetics**, 2011. v. 32, n. 2, p. 140–147.

TEODORI, L. *et al.* Static magnetic fields affect cell size, shape, orientation, and membrane surface of human glioblastoma cells, as demonstrated by electron, optic, and atomic force microscopy. **Cytometry Part A**, 2006. v. 69, n. 2, p. 75–85.

TIAN, X. *et al.* Magnetic field direction differentially impacts the growth of different cell types. **Electromagnetic Biology and Medicine**, 2018. v. 37, n. 2, p. 114–125.

VERKHRATSKY, A.; NEDERGAARD, M. Physiology of astroglia. **Physiological Reviews**, 2018. v. 98, n. 1, p. 239–389.

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, 2006. v. 1, n. 3, p. 1112–1116.

ZHANG, L. *et al.* Cell type- and density-dependent effect of 1 T static magnetic field on cell proliferation. **Oncotarget**, 2017. v. 8, n. 8, p. 13126–13141.

ZHAO, G. *et al.* Cellular ATP content was decreased by a homogeneous 8.5 T static magnetic field exposure: Role of reactive oxygen species. **Bioelectromagnetics**, 2011. v. 32, n. 2, p. 94–101.

Legendas das Figuras

Figura 1: Imagens obtidas em Microscópio de Luz Invertido das culturas de astrócitos. As imagens das culturas de astrócitos foram capturadas no primeiro (D1) e no sétimo dia de estimulação magnética estática (D7); Grupos: C (controle), 5 (5 min de estimulação) 15 (15 min de estimulação), 30 (30 min de estimulação). Aumento 400X

Figura 2: Efeito da estimulação magnética estática sobre a densidade celular por conteúdo proteico total em astrócitos. Os astrócitos foram expostos a estimulação magnética estática por 5 min, 15 min, 30 min durante 7 dias consecutivos. *Significativamente diferente do controle: 5 min ($p = 0,025$) e 15 min ($p < 0,0001$)

Figura 3: Efeito da estimulação magnética estática sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em astrócitos. As culturas de astrócitos foram expostas a estimulação magnética estática por 5min, 15min e 30min diários durante 7 dias consecutivos. *Significativamente diferente do controle ($p < 0,0001$)

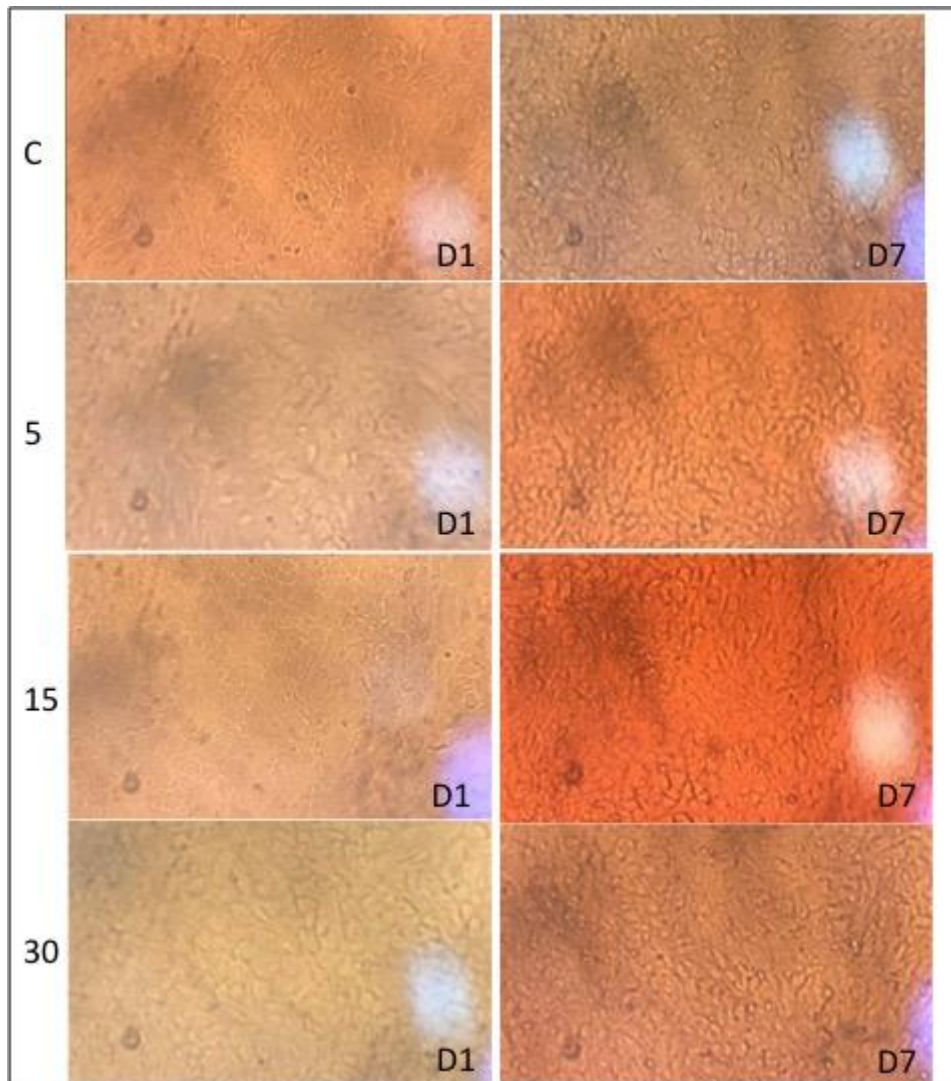


Figura 1

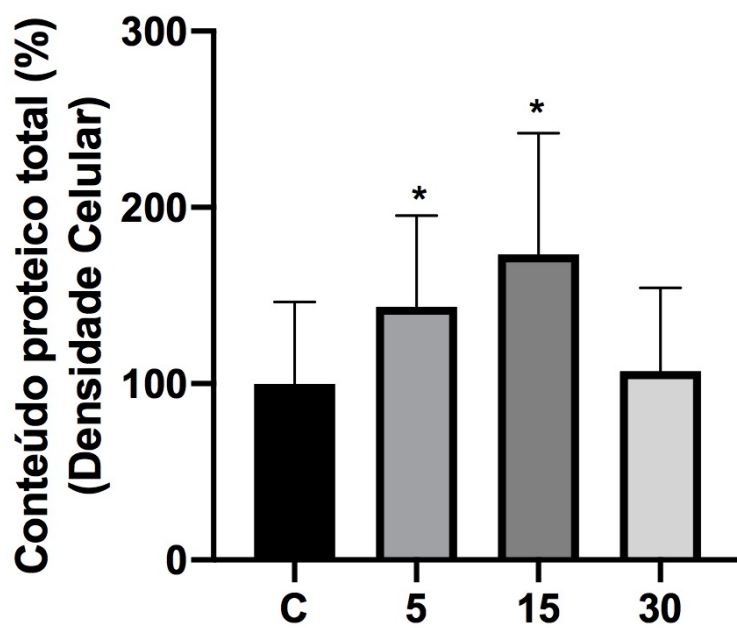


Figura 2

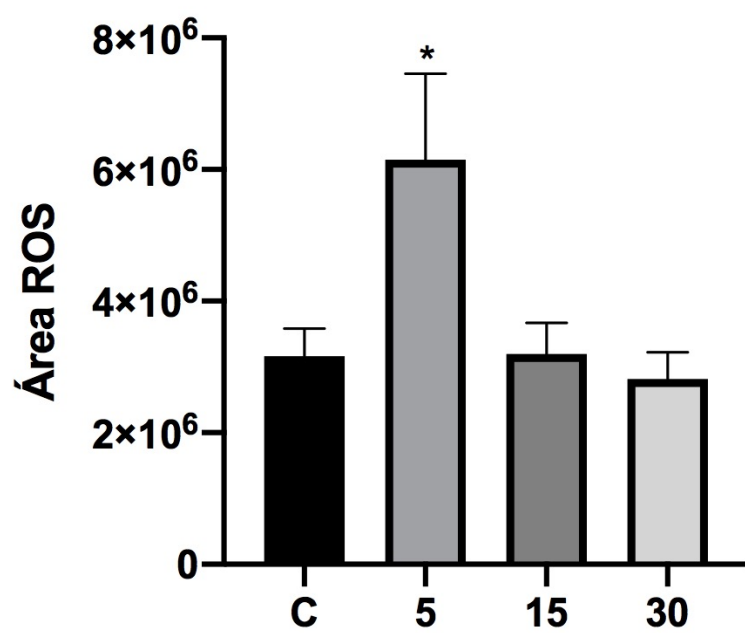


Figura 3

4.2 Manuscrito 2 - submetido ao periódico, *Brain Stimulation*

Static magnetic stimulation induces changes in the cell viability parameters of astrocytes in a primary culture model

Brain Stimulation

STATIC MAGNETIC STIMULATION INDUCES CHANGES IN THE CELL VIABILITY PARAMETERS OF ASTROCYTES IN A PRIMARY CULTURE MODEL

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Original Article
Keywords:	Astrocytes culture, static magnetic field, cell viability, oxidative stress, mitochondrial function
Corresponding Author:	Izabel Cristina Custodio de Souza, PhD Universidade Federal de Pelotas Pelotas, Rio Grande do Sul BRAZIL
First Author:	CAROLINE CRESPO DA COSTA
Order of Authors:	CAROLINE CRESPO DA COSTA Leo Anderson Meira Martins ANDRÉ PERES KOTH JÉSSICA MARQUES OBELAR RAMOS FÁTIMA THERESINHA COSTA RODRIGUES GUMA CLEVERSON MORAES DE OLIVEIRA NATHÁLIA STARK PEDRA GEFERSON FISCHER EDUARDA SANTA HELENA CAROLINA ROSA GIODA PAULO ROBERTO STEFANI SANCHES ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES ROSÉLIA MARIA SPANEVELLO GIOVANA DUZZO GAMARO Izabel Cristina Custodio de Souza, PhD
Abstract:	<p>Objectives: Understanding the effects of magnetic fields (MF) at the cellular level is of utmost importance due to their increasing use for therapeutic purposes. Cells from the central nervous system (CNS) are subject to the direct action of a MF during therapeutic use of a static magnetic field (SMF). Astrocytes are cells that play a key role in the function of the CNS, and there are few studies evaluating the consequences of a SMF on these cells. Thus, we aimed to evaluate the effects of a medium-intensity SMF (305 mT) in a primary culture of cortical astrocytes obtained from neonatal (1-2-day-old) Wistar rats. Materials and Methods: After reaching confluence (approximately the 18th day), cells were subjected to a SMF stimulation for 5 min, 15 min, 30 min and 40 min daily for 7 consecutive days. Then, cell viability, mitochondrial function, cell cycle, and oxidative stress parameters were analysed. Results: SMF stimulation for 15, 30 and 40 min decreased cell viability and induced cell death by necrosis. SMF stimulation for 40 minutes changed cell cycle. All stimulated groups presented a reduction in mitochondrial function, although imaging analysis did not reveal substantial changes in mitochondrial network. There was also a reduction in antioxidant capacity in the groups stimulated for 5 and 40 min and an increase in lipidic peroxidation in all stimulated groups. No difference in the enzymatic activity of superoxide dismutase and catalase or in the total thiol content was observed. Conclusion: Here we introduce new insights for understanding health/normal astrocytes' response to the SMF stimulation since this therapeutic approach has been</p>

	largely used against neurological and psychiatric diseases.
Suggested Reviewers:	Liciane Fernandes Medeiros, PhD liciane.medeiros@unilasalle.edu.br Expertise in Pharmacology, Cell biology, Physiology, Neuromodulation Cell and many publications with magnetic and electrical stimulation Professora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento Humano da Universidade La Salle - Canoas/RS.
	Adriano Martimbianco de Assis, PhD adriano.assis@ucpel.edu.br Expertise in neuroenergetics and neuroprotection, physiology, biochemistry
	Carmem Silveira Gottfried, PhD cgottfried@ufrgs.br Expertise in neuroenergetics and neuroprotection, physiology, biochemistry
	Jade de Oliveira, PhD 00317650@ufrgs.br Expertise in neuroenergetics and neuroprotection, physiology, biochemistry

**STATIC MAGNETIC STIMULATION INDUCES CHANGES IN THE CELL
VIABILITY PARAMETERS OF ASTROCYTES IN A PRIMARY CULTURE MODEL**

CAROLINE CRESPO DA COSTA^a; LEO ANDERSON MEIRA MARTINS^b; ANDRÉ PERES
KOTH^c; JÉSSICA MARQUES OBELAR RAMOS^d; FÁTIMA THERESINHA COSTA
RODRIGUES GUMA^e; CLEVERSON MORAES DE OLIVEIRA^f; NATHÁLIA STARK
PEDRA^g; GEFERSON FISCHER^h; EDUARDA SANTA HELENAⁱ; CAROLINA ROSA
GIODA^j; PAULO ROBERTO STEFANI SANCHES^k; ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR^l
MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES^m; ROSÉLIA MARIA SPANEVELLOⁿ;
GIOVANA DUZZO GAMARO^o; IZABEL CRISTINA CUSTÓDIO DE SOUZA^p

^a NeuroCell Laboratory, Universidade Federal de Pelotas (Campus Universitário, S/N, Capão do Leão-RS, Brasil, Zip Code 96160-000) – carolneuro@yahoo.com.br

^b Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (Rua Sarmento Leite, 500, Bairro Centro Histórico, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, Zip Code 90050-170) - leo.meira@ufrgs.br

^c NeuroCell Laboratory, Universidade Federal de Pelotas (Campus Universitário, S/N, Capão do Leão-RS, Brasil, Zip Code 96160-000) - andrekoth@hotmail.com

^d NeuroCell Laboratory, Universidade Federal de Pelotas (Campus Universitário, S/N, Capão do Leão-RS, Brasil, Zip Code 96160-000) - jessicaobelar@gmail.com

^e Laboratory of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (Rua Ramiro Barcelos, 2600, Bairro Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, Zip Code 90035-000) – fatima.guma@ufrgs.br

^f Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (Rua Ramiro Barcelos, 2600, Bairro Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, Zip Code 90035-000) – cleverson218@yahoo.com.br

^g Laboratory of Neurochemistry, Inflammation and Cancer, Universidade Federal de Pelotas (Campus Universitário, S/N, Capão do Leão-RS, Brasil, Zip Code 96160-000)- nathaliastark@hotmail.com

^h Laboratory of Virology and Immunology, Universidade Federal de Pelotas (Campus Universitário, S/N, Capão do Leão-RS, Brasil, Zip Code 96160-000 - geferson.fischer@gmail.com

ⁱ Department of Physiological Sciences, Universidade Federal de Rio Grande (Avenida Itália, Km 8, Bairro Carreiros, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, Zip Code 96203-900) - eduarda.shelena@hotmail.com

^j Department of Physiological Sciences, Universidade Federal de Rio Grande (Avenida Itália, Km 8, Bairro Carreiros, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, Zip Code 96203-900) - carolinagioda@yahoo.com.br

^k Laboratory of the Research and Development Service in Biomedical Engineering- Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Rua Ramiro Barcelos, 2350- Bairro Santa Cecília- Porto Alegre-RS, Brasil, Zip Code 90035-903) - psanches@hcpa.edu.br

^l Institute of Biological Science, Universidade Federal do Rio Grande (Avenida Itália, Km 8, Bairro Carreiros, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, Zip Code 96203-900) - varelaejas@hotmail.com

^m Laboratory of Neurochemistry, Inflammation and Cancer, Universidade Federal de Pelotas (Campus Universitário, S/N, Capão do Leão-RS, Brasil, Zip Code 96160-000) - mspereirasoares@gmail.com

ⁿ Laboratory of Neurochemistry, Inflammation and Cancer, Post-Graduate Program in Biochemistry and Bioprospection, Universidade Federal de Pelotas (Campus Universitário, S/N, Capão do Leão-RS, Brasil, Zip Code 96160-000) - rspanevello@gmail.com

^o NeuroCell Laboratory, Universidade Federal de Pelotas (Campus Universitário, S/N, Capão do Leão-RS, Brasil, Zip Code 96160-000) - giovanagamaro@hotmail.com

^p Coordinator of NeuroCell Laboratory, Laboratory of Histology, Department of Morphology, Post-Graduate Program in Biochemistry and Bioprospection, Universidade Federal de Pelotas; izabel.souza@ufpel.edu.br; belcustodio20@yahoo.com.br; Avenue Duque de Caxias, 250. CEP 96030-000, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

FUNDING

This study was financed in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- Brasil (CNPq) (edital MCTI/CNPQ/UNIVERSAL 14/2014) and HCPA Biomedical Engineering Laboratory (MCT/Finep/COENG).

DECLARATIONS OF INTEREST

None

Corresponding author: Coordinator of NeuroCell Laboratory, Universidade Federal de Pelotas; izabel.souza@ufpel.edu.br; belcustodio20@yahoo.com.br; Avenue Duque de Caxias, 250.

Department of Morphology, Laboratory of Histology. CEP 96030-000, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

ABSTRACT

Objectives: Understanding the effects of magnetic fields (MF) at the cellular level is of utmost importance due to their increasing use for therapeutic purposes. Cells from the central nervous system (CNS) are subject to the direct action of a MF during therapeutic use of a static magnetic field (SMF). Astrocytes are cells that play a key role in the function of the CNS, and there are few studies evaluating the consequences of a SMF on these cells. Thus, we aimed to evaluate the effects of a medium-intensity SMF (305 mT) in a primary culture of cortical astrocytes obtained from neonatal (1-2-day-old) Wistar rats. **Materials and Methods:** After reaching confluence (approximately the 18th day), cells were subjected to a SMF stimulation for 5 min, 15 min, 30 min and 40 min daily for 7 consecutive days. Then, cell viability, mitochondrial function, cell cycle, and oxidative stress parameters were analysed. **Results:** SMF stimulation for 15, 30 and 40 min decreased cell viability and induced cell death by necrosis. SMF stimulation for 40 minutes changed cell cycle. All stimulated groups presented a reduction in mitochondrial function, although imaging analysis did not reveal substantial changes in mitochondrial network. There was also a reduction in antioxidant capacity in the groups stimulated for 5 and 40 min and an increase in lipidic peroxidation in all stimulated groups. No difference in the enzymatic activity of superoxide dismutase and catalase or in the total thiol content was observed.

Conclusion: Here we introduce new insights for understanding health/normal astrocytes' response to the SMF stimulation since this therapeutic approach has been largely used against neurological and psychiatric diseases.

KEYWORDS

Astrocytes culture, static magnetic field, cell viability, oxidative stress, mitochondrial function

ETHICS APPROVAL

Experimental procedures were approved by the Committee on Ethics and Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas, Brazil (protocol number CEEA 4408-2016), and the use of animals was in accordance with the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Scientific Research Activities (DBCA), the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

ABBREVIATIONS

CNS - central nervous system

CONCEA - National Council for Control of Animal Experimentation

DMSO - dimethylsulfoxide

MF - magnetic fields

MTG - MitoTracker Green

MTR - MitoTracker Red

NeFeB - neodymium-iron-boron

SMF - static magnetic field

1 INTRODUCTION

The use of non-invasive neuromodulation to treat neurologic and psychiatric disorders has been growing in recent years because it is a method with promising results for symptom relief [1–4]. Non-invasive neuromodulation has been studied and used as a complementary treatment for several pathologies and symptom, including photophobia, chronic pain, depression, Parkinson’s disease, multiple sclerosis, epilepsy, stroke and others [3,5–9]. In addition to pathological cells, healthy cells may be affected during this therapy, and the positive effects experienced by patients include the activation of neurons and glial cells [10,11].

Recent animal studies have been fundamental for identifying several potential mechanisms by which this kind of stimulation can produce clinical effects. Rodent studies have shown that magnetic stimulation induces neuroprotective effects and stimulates neuroplasticity [1,12–14]. However, most research has assessed the effects of stimulation on neurons, and few studies evaluated other cell types. Astrocytes are the most abundant cells in the brain (comprising 20%-40% of all brain cells) and play a key role in the healthy brain [15,16]. Astrocytes are involved in the formation of the blood-brain barrier, the metabolism of some neurotransmitters, the secretion of active components (gliotransmitters) and the maintenance of extracellular ion balance to ensure cerebral homeostasis by providing metabolic support to neurons and synaptic communication. The many ways astrocytes can influence brain metabolism make these cells an important target for therapeutic interventions [17–21]. Thus, it is important to understand the effects of magnetic stimulation in healthy astrocytes.

Establishing a primary culture of astrocytes seems to be an effective way to achieve new insights into the cell response to magnetic stimulation because *in vitro* approaches allow us to observe several effects in a controlled manner with an ideal environment and conditions. In this

way, Clarke et al. (2017b) evaluated the effects of repetitive 18 mT magnetic stimulation of 10 minutes of duration in astrocyte culture and found that a frequency of 1 Hz increases intracellular calcium levels [18]. Khodarahmi et al. (2010) observed that strong static magnetic stimulation at 2.1 T for 72 hours did not affect the morphology of rat spinal cord astrocytes [22]. Buemi et al. evaluated the effects of a 0.5 mT static magnetic field on rat cortical astrocyte cultures after 2, 4 and 6 days of stimulation and observed increases in apoptosis, necrosis and actively proliferating cells [23]. Bodega et al. (2005) applied static, sinusoidal and combined magnetic fields in astrocyte culture and evaluated parameters such as GFAP, hsp 25, hsp 70, hsp 60 and actin 24 h after exposure, and they noted that there was no difference among types and exposure time [10]. Chan et al. (1999) observed an increase in GFAP expression in response to 0.63 T pulsed magnetic stimulation on the third day after stimulation, but this change was transient, and GFAP expression returned to control levels at day five. In addition, there was an increase in the protein level. However, the authors did not find morphological differences [24]. Nakamichi et al. (2009) imposed 100 mT static stimulation in a culture of progenitor neural cells during 12 days and found a reduction in cell proliferation without altered viability and a reduction in GFAP with a concomitant increase in immunoreactive cell differentiation [25].

Despite the large number of studies being done in this area, we still have little knowledge on the effects of these therapies at the cellular levels because most of studies are performed intending to understand the magnetic stimulation effects against brain pathologies or considering brain response as whole. Also, the obtained results usually are conflicting since there are a variety of stimulus types, intensities, exposure times and evaluation parameters. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of 305 mT moderate static magnetic stimulation specifically on healthy primary cultures of cerebral cortex astrocytes from Wistar rats. For this

purpose, we evaluated cell viability, protein expression, mitochondrial function, cell membrane and oxidative stress in response to Static Magnetic Field Stimulation applied through a specially designed device: a plate attached to a 24-well plate stand with NeFeB (neodymium-iron-boron) magnets with a cylindrical shape of 12 mm (diameter) by 6 mm (height).

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Astrocyte cultures

Astrocytes were obtained from the cortex of neonatal rats (1-2-day-old Wistar rats from the Federal University of Pelotas Bioterium). Primary astrocytic cultures were prepared based on the protocols described by Schildge et al. (2013) and Funchal and Dani (2014) [26,27]. The cortex was dissected, placed in Hanks' Balanced Salt solution (HBSS- Gibco-ref. 14175) and mechanically dissociated using glass Pasteur pipettes. The solution was centrifuged at 1400 rpm for 7 min, and the pellet was resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM low glucose, Sigma, ref. D5523) enriched with 10% foetal bovine serum (FBS, Gibco, ref. 12657-029), gentamicin and amphotericin B. We seeded 70,000 cells/well into 24-well plates previously coated with poly-L-lysine, and the cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. After reaching confluence (approximately the 18th day), the cells were split into 5 groups: the control group (CT, not stimulated) and the stimulated groups that received daily stimulation for 5 min (S5), 15 min (S15), 30 min (S30) and 40 min (S40) from the 18th to 24th day. The control group received no static magnetic stimulation. Cell medium was changed every three days. After the last stimulation, all analyses were performed.

2.2 Immunocytochemistry (GFAP)

To confirm that the primary cell culture was homogenous and to observe astrocyte reactivity, immunocytochemical staining of GFAP was performed using a monoclonal antibody (GA5-mouse, mAb #3670, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Briefly, after magnetic stimulation, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 20 min at room temperature, blocked with 2% bovine albumin for 1 h, and incubated with anti-GFAP overnight. Then, the cells were washed with PBS and incubated at room temperature for 1 h with Alexa Fluor 488 (Invitrogen, USA). Cell nuclei were stained with 0.2 mg/ml 49,69-diamidino-2-phenylindole (DAPI) [28,29]. Cells were visualized at 20x magnification lens using an inverted fluorescence microscope (FLoid™ Cell Imaging Station, Life, Thermo Fischer Scientific, MA, USA). For each group, images were acquired from two different fields in three different cultures. The percentage of Hoechst- and GFAP-positive cells were quantified in relation to the total number of Hoechst-positive nuclei using the free JAVA-based software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

2.3 Static magnetic field (SMF)

Cell culture stimulation was performed in a specially designed plate attached to a 24-well plate stand with NeFeB (neodymium-iron-boron) magnets with a cylindrical shape of 12 mm (diameter) by 6 mm (height) (Fig. 1A and B). Each stand had six spaced magnets to avoid interactions among the different sources of magnetic fields. The distance between the culture plate and the support was adjusted to guarantee the magnetic field strength in the culture plate wells. Adherent cells were cultured in wells above magnets, such as it was demonstrated at

figure 1B. Thus, for each culture plate, cells were cultured at only six wells, which were stimulated at the same period in a homogeneous way. The magnetic field traversed a layer or several layers of cells in the same way, *i.e.*, cell grouping or density did not change the field. Adjustment of the magnetic field was performed with a customized screw, and the magnetic field was measured using a Hall Effect Gaussmeter (Teslameter Kashava 5, Wuntronic GmbH, Germany), available at the HCPA Biomedical Engineering Laboratory. We choose a magnetic field with a strength of 305 mT ($\pm 2\%$ tolerance), which is a moderate field. Magnetic fields with intensities of 100 mT and 200 mT were previously tested with this same device [30]. There are a variety of protocols, but we chose to test the effects of daily cellular magnetic stimulation (5 min, 15 min, 30 min, 40 min) applied for seven consecutive days because we considered this approach to be similar clinical research applications [31–34]. Cells were cultured above the north pole of magnet, inside the CO₂ incubator to avoid possible cellular damage caused by keeping cells outside of the ideal environment for long periods.

2.4 Trypan blue exclusion

The trypan blue exclusion assay was used to assess cell viability. This method is based on the fact that dead cells absorb trypan blue into their cytoplasm due to loss of membrane selectivity, while living cells remain intact. After the last treatment, the medium was removed from the culture plate, and the cells were washed with PBS for harvesting using 0.25% trypsin (Gibco) for not more than 1 minute. Cell detachment was observed through optical microscopy and then, Trypsin was inactivated by adding culture medium. Sequentially, 0.2% trypan blue was added and only living cells (trypan blue negative cells) were counted in a Neubauer chamber [35]. Results were expressed as relative percentage from control (Control = 100%).

2.5 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (MTT assay)

Cell viability was assessed using the MTT assay, which consists of quantifying the activity of cellular dehydrogenases that reduce MTT salt (Sigma, ref. M2128) to the purple formazan product [36]. Thus, the generated amount of formazan depends on the metabolically active mitochondria from live cells. The protocol was performed according to Mosmann (1983). Briefly, after the last day of treatment, cells were incubated with an MTT stock solution (0,05 mg MTT/100 µl DMEM) for 4 h at 37°C and 5% CO₂. Thereafter, the medium and MTT solution were removed, and the formazan crystals were diluted in dimethylsulfoxide (DMSO). Absorbance was quantified with a spectrophotometer (TP-Reader, Thermo Plate) at 540 nm [36]. Results were expressed as relative percentage from control (Control = 100%)

2.6 Determination of mitochondrial activity and mass by fluorometry

The fluorescent dyes MitoTracker Green (MTG) and MitoTracker Red (MTR) are able to selectively stain mitochondria of living cells, thus being used for assessing organelle function [37,38]. Briefly, MTG dye stains mitochondria by accumulating in the mitochondrial lipid environment (representing mitochondrial mass), and MTR dye depends upon mitochondrial membrane potential (representing mitochondrial function). Thus, establishing the ratio of MTR/MTG staining reveals mitochondrial function since an increase in mitochondrial mass over mitochondrial function may represent organelle damage or swelling [37,38]. After the last stimulation, the cells were washed with PBS, trypsinized for not more than 1 minute,

resuspended and incubated in the dark for 20 min with 100 nM MTG and MTR previously diluted in preheated DMEM at 37°C. Fluorescence was measured by a microplate reader fluorimeter (M5, Molecular Devices, USA). Normalization of the results was performed by measuring the protein content as described by Peterson (1979) [39]. Results were expressed as Relative Units of Fluorescence (R.F.U.). MTR-stained cells were also visualized at a 20x magnification with an inverted fluorescence microscope (FLoid™ Cell Imaging Station, Life, Thermo Fischer Scientific, MA, USA).

2.7 Flow cytometry

For all experiments involving flow cytometry (cell apoptosis assay, membrane fluidity and cell cycle), samples were first prepared as follows. After the last day of treatment, cells were washed twice with PBS and trypsinized. Afterwards, trypsin was inactivated with DMEM enriched with 10% FBS, and the cells were centrifuged at 1000 g for 10 min. The supernatant was discarded, and the cells were resuspended in PBS.

Flow cytometry analysis was performed using an Attune® Acoustic Focusing Flow Cytometer (Applied Biosystems, USA). The acquisition rate was 200 events/s, totalling 10,000 events per sample. The results were analysed using Attune Cytometric Software v2.1. The noncellular events were eliminated from the analysis by scatter plots of forward scatter (FSC) × side scatter (SSC) and events negative for Hoechst 33342 fluorescence (Ref. B2261, Sigma-Aldrich, USA) (debris). Events were detected by fluorochrome with a violet laser (405 nm) and photomultiplier (PMT) VL1 (filter 450/40 nm). The green, orange, and red fluorescence was analysed by a blue laser (488 nm) and PMT BL1 (filter 530/30 nm), BL2 (filter 575/24 nm), and

BL3 (filter > 640 nm) filters, respectively. Flow cytometry fluorescence stability was tested daily using standard beads (Invitrogen, USA).

2.7.1 Membrane fluidity

The cell membrane was evaluated using Merocyanine-540 (2.7 μ M-Sigma) and the YO-PRO1 marker (100 nM-Invitrogen). Merocyanine 540 (M540) binds to membranes with loosely packed lipids, whereas YO-PRO-1 stains the nuclei of cells with increased plasma membrane permeability (“apoptotic” or dead). Thus, cells positive for M540 and YO-PRO-1 are considered to have higher membrane fluidity/permeability consistent with cell death [40]. Briefly, samples were prepared in PBS with 2.7 mM M540 and 0.1 mM YO-PRO-1. After 15 minutes at 37 °C in the dark, the samples were analysed. Data are expressed as the percentage of cells with high membrane fluidity.

2.7.2 Cell cycle analyses

For cell cycle analysis, cells were stained with 5 μ g/ml Hoechst 33342 (Ref. B2261-Sigma-USA) for 30 min at 37°C. Ten thousand events per sample were measured, and the percentage of cells in each phase was determined (G1, S and G2) [41,42].

2.7.3 Cell apoptosis assay

Apoptosis was assessed using an Annexin V-FITC kit (Ref. A9210-Sigma-USA). Cell suspensions were placed in binding buffer in the presence of Annexin V-FITC (v:v, 5:100). After 30 min of incubation, the suspensions were washed with binding buffer and centrifuged, and propidium iodide (Ref. P4170-Sigma-USA) was added (1 μ g/ml) for 20 min [43].

2.8 Measurement of total antioxidant capacity (ACAP)

After the last day of treatment, the cells were resuspended, and the product was centrifuged ($10,000 \times g$) at 4°C for 20 min. Aliquots of 15 μL of each sample (three replicates) were placed into a plate with 120 μL of buffer (Hepes, KCl, MgCl_2 and water), 10 μL of water or ABAP (2,2'-azobis (2 methylpropionatemidine) dihydrochloride) (Sigma-Aldrich, USA) and 20 μL of $\text{H}_2\text{DCF-DA}$. The fluorescence intensity was determined over 60 min at 37°C using a fluorometer (Victor 2, Perkin Elmer) with excitation and emission wavelengths of 485 and 520 nm, respectively. The antioxidant capacity was expressed in terms of the fluorescence area after fitting the fluorescence data to a second-order polynomial and integrating between 0 and 60 min to obtain its area, which is the inverse of the difference in fluorescence area with and without ABAP [44].

2.9 Measurement of catalase (CAT) activity

The activity of CAT for each group was quantified in 10 μl of cell lysates by evaluating the decomposition of H_2O_2 , which was continuously monitored at 240 nm for 180 s [45]. The CAT activity is reported as a percentage of the control (Control=100%).

2.10 Measurement of superoxide dismutase (SOD) activity

The activity of SOD for each group was measured in 10 μl of cell lysates, and the method was based on the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation to adenochrome. The absorbance was measured using a microplate reader (SpectraMax M3) at 480 nm [46]. The results are expressed as a percentage of the control (Control=100%).

2.11 Measurement of total sulfhydryl (SH) content

The total SH content for each group was measured in 10 μ l of cell lysates using the 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) reagent. In summary, the reduction of DTNB by thiols generated a yellow derivative (TNB) whose absorbance was read at 412 nm [47]. The total SH levels were described as a percentage of the control (Control=100%).

2.12 Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)

The TBARS assay was performed according to Federici et al. (2007), using 40 μ l of homogenate (in triplicate), added to a well of a 96-well microtiter plate (in triplicate), containing 1 mol/L butylated hydroxytoluene (2,6-di-O-tert-butyl-4-methylphenol), and the final volume was made up to 2 l with 1 mmol/L phosphate-buffered saline (pH 7.4). Next, 50% trichloroacetic acid (TCA) and 1.3% thiobarbituric acid (TBA) (dissolved in 0.3% (w/v) NaOH) were added, and the plate was incubated at 60°C (60 min) and then cooled on ice. Absorbances were read at 530 and 630 nm, corrected for turbidity, and read against standards [48].

2.13 Statistical analysis

The data were analysed using SPSS (version 17.0, IBM, NY, USA) and GraphPad Prism (version 8, GraphPad Software, CA, USA). After testing normality and homogeneity of variance accordingly to Shapiro-Wilk test, the effect of magnetic stimulation on astrocytes was assessed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons. F-test in one-way ANOVA was used for assessing how our samples differ from each other by estimating their dispersion from mean. For each analysis, it was performed three independent experiments. For each experiment (n=6), it was used a pool of cortex astrocytes

from three neonatal Wistar Rats. The data are expressed as the mean \pm SD. The results were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

3 RESULTS

The GFAP expression visualization by fluorescence microscopy showed that the culture was homogeneous in all groups, and the majority of the cells (~90%) were Hoechst and GFAP-positive, indicating that the culture was basically astrocytes (Fig. 2 a and b).

The Trypan blue assay demonstrated that at 5 min, 15 min and 30 min after daily SMS for 7 days, there was a reduction in cell number compared to the control ($F_{4,111}=5.079$; $p=0.0132$, $p=0.0015$, $p=0.0137$, respectively). However, when stimulation was performed for 40 min daily, no difference was found when compared to the control ($p=0.0903$; Fig. 3a).

Our results showed that 30 min of daily SMS for 7 days decreased cell viability compared with that of the control group ($F_{4,125} = 7.085$; $p = 0.0032$; Fig. 3b) by MTT assay. There was no significant difference between the other stimulated groups and the control.

Individually, daily SMS for 7 days did not trigger alteration in the MTR and MTG fluorescence when compared to control cells (Fig 4a and 4b, respectively; $F_{4,29}=1.364$ and $p=0,2706$ for MTG and $F_{4,29}=0,6353$; $p=0,6414$ for MTR). However, when establishing the MTR/MTG ratio, it was observed a significant decrease at all stimulation times ($F_{4,29}=7.994$; $p=0.0419$, $p=0.0047$, $p=0.0003$, $p=0.0035$, respectively), thus indicating that the stimulated groups had a decreased mitochondrial function (Fig 4c). Despite the mitochondrial alteration in stimulated cells, the organelles' morphology in these groups appeared to be similar to the control cells (Fig. 4d).

Through flow cytometry, we evaluated membrane fluidity/dead cells, the cell cycle and apoptosis/necrosis. Fig.5a shows that static magnetic stimulation increased membrane fluidity/dead cells only in the group S40 ($F_{4,25}=11.08$, $p<0.0001$) as compared to the control. When we evaluated the cell cycle, we found the majority of cells in the G1 phase in all groups. There was a change in cell cycle progression in the S40 group, which showed a significant increase in the percentage of G1 phase cells compared to the control (8.83% more cells in G1, $p=0.0407$) and a reduction in G2 phase cells (11.23% fewer cells in G2 phase, $p=0.0018$; Fig. 5b). The other groups did not show a significant difference compared to unstimulated cells. Through the annexin/PI assay, we observed a significant increase in the percentage of necrotic cells in the S15, S30 and S40 groups compared to the control group ($F_{4,25}=108.7$, $p<0.0001$) and a significant reduction in the population of viable cells in these same groups ($F_{4,25}=100.5$, $p<0.0001$) (Fig. 5c). The percentage of apoptotic cells was less than 1% in all groups, and there was no significant difference between them.

The antioxidant capacity was significantly reduced in the S5 and S40 groups ($F_{4,24}=25.81$; $p<0.0001$) compared to the control group (Fig. 6a). In contrast, there was no statistically significant change in the activity of the enzymes CAT and SOD, with all stimulated groups equal to the control group ($F_{4,43}=1.089$ and $F_{4,49}=2.862$, respectively; Figs. 6b and 6c). Similarly, total thiol content values were not different between groups ($F_{4,49}=1.513$; Fig. 6d). Lipidic peroxidation was significantly higher in all stimulated groups than in the control group, with cells stimulated for 40 min daily for 7 days showing the highest levels of TBARS, followed by those stimulated for 5 and 30 min and then those stimulated for 15 min ($F_{4,25}=102.2$; $p<0.0001$; Fig. 6e).

4 DISCUSSION

Due to the heterogeneity of astrocyte functions in normal CNS activities, these cells may have different functions in each brain region [16,49,50]. Additionally, several studies suggest that astrocytes respond differently to various types of CNS injury or disease in animal models [16,51]. SMF stimulation has been applied to treat several CNS pathologies and may influence the response of astrocytes to injury. However, many studies have revealed that the effects of SMF vary according to the time and intensity of application [52]. In the same way, different injured cells from the CNS tend to differentially respond to this treatment. In addition, little is known about the behaviour of normal cells, including astrocytes, in response to a SMF. Thus, the possible changes in cellular function caused by a 305 mT static magnetic field, which was applied for seven days in primary culture of cortex astrocytes, and its effects were investigated in this study.

After stimulation, cell viability was assessed using different assays. The Trypan Blue experiment showed a significant reduction in the number of live cells in the S5, S15 and S30 groups and no significant reduction in the S40 group compared to the control. The MTT assay demonstrated a reduction in cell viability in the S30 group. Both methods present differences that should be considered: while Trypan Blue assesses the integrity of the cell membrane (since nonviable cells let Trypan Blue dye penetrate inside the cell), MTT assesses mitochondrial function by measuring cell metabolic activity. Thus, we evaluated cell mitochondrial function by establishing the relationship between the function and mass of mitochondria using the fluorescent markers MTR and MTG as another tool to assess cell viability, considering the role of mitochondria in cell survival and death. After analysis, we observed a decrease in the MTR/MTG fluorescence ratio in all stimulated groups, and this situation could be due to

mitochondrial dysfunction, which may impair cell viability. Indeed, it is already known that static magnetic stimulation causes a reduction in the mitochondrial transmembrane potential, although the mechanism is not yet understood [53]. Although we recognize that more quantitative investigation would be helpful on investigating mitochondrial morphology, no apparently differences were visualized through fluorescence microscopy: all groups presented mitochondrial network homogenously distributed along cell cytoplasm.

From the MTR/MTG results, we evaluated whether SMF could trigger the activation of apoptosis or necrosis, two important mitochondria-related death pathways, through the Annexin/PI assay. Indeed, cell death by necrosis or apoptosis is usually accompanied by mitochondrial damage, which can lead to a loss of mitochondrial potential [37]. We found a reduction in cell viability in the S15, S30 and S40 groups. The increase in the number of necrotic cells observed only in groups that received magnetic stimulation and the reduction in the MTR/MTG ratio could be directly related to mitochondrial dysfunction in astrocytes.

Another interesting finding is that in the analysis of the cell cycle, the S5, S15 and S30 groups did not differ from the control, presenting the largest population in phase G1 and the smallest in phase S. However, in the 40 min stimulated group, there was a significant increase in the cell population in phase G1 and a significant reduction in the cell population in phase G2 when compared to the control group, suggesting a delay in the progression of the cell cycle. SMS caused retention of the cell population in phase G1 in plant cell culture [54]. In contrast, there was a reduction in the cell population in phase G1 in human mesenchymal stem cells [55]. These contradictory results may be related to different cellular responses as well as different intensities and times of stimulation. The results obtained by our group indicate that a large number of

primary cortical astrocytes remain in G1, possibly in a quiescent (G0) state or undergoing differentiation.

It is important to consider that our previous study demonstrated an increase in sulforhodamine B staining in cells exposed to a SMF for 5 and 15 min [56]. Sulforhodamine B assay is classically used for estimating cell population through measuring the content of plasma membrane protein. However, this dye can also stain cell debris and thus, it would not distinguish between viable and dead cells [57]. We here found opposite results to sulforhodamine B staining, but we here used several other cell viabilities tests that are focused on cell metabolism, which are more precise. Overall, regardless of the methods used, cells that received static magnetic stimulation presented a reduction in the number of viable astrocytes, and similar results were found by other researchers, which demonstrated the gradual increase of necrosis and apoptosis in astrocytes exposed to 6 days of a weak SMF at 0.5 mT [23]. The same effect was observed in glioblastoma (tumour cells) and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) exposed to a moderate intensity of 300 mT for 48 h [58,59]. On the other hand, Hirai (2005) has submitted a primary culture of neurons to daily 15 minutes-static magnetic stimulation (100mT) during 8 consecutive days and they did not observe any significative alteration on cell surviving measured only by the MTT assay [60]. It is worthwhile to observe that the used stimuli were less than what was used in our study. In addition, Medeiros et al. (2020) also evaluate the effects of static magnetic stimulation at 300mT in the human neuroblastoma line SH-SY5Y and they found that 2 hour-stimuli did not significantly change cell viability but 24hours-stimuli reduced cell viability when compared to unstimulated cells [30]. In this way, it is important to observe that SH-SY5Y are a tumoral model and these cells are possibly more resistant than normal cells, such as the

primary culture of astrocytes used in our study, thus being less sensible to the damage induced by static magnetic field stimulation

Our results regarding cell viability may be related to the idea that astrocytes are very heterogeneous, integrate multifunctionally and morphologically into neural networks and clearly demonstrate adaptive plasticity for maintenance of the CNS [61]. Cells have mechanisms to promote cellular homeostasis in response to several types of insults that trigger damage to organelles [62,63]. However, the transition to survival or death is still controversial.

Considering the abovementioned results, analyses related to antioxidant profiles and oxidative stress were performed. We observed a significant increase in lipid peroxidation in all stimulated groups (S5, S15, S30 and S40) when compared to the control. However, there was no difference in SOD and CAT enzyme activity or in the total thiol content among groups. This data can be explained, at least partly, by the involvement of other antioxidant-related pathways, especially involving the glutathione system, which includes the glutathione peroxidase and reductase enzymes. In addition, it is possible that oxidative damage may be due to reactive nitrogen species [64,65]. In this way, we found a significant reduction in the total antioxidant capacity (ACAP) in the groups stimulated for 5 and 40 min (early and later). The ACAP method evaluates antioxidant systems (enzymatic and nonenzymatic) against peroxy radicals that are not substrates of SOD and CAT. Thus, the increased lipid peroxidation (TBARS levels) in the same groups can indicate a redox imbalance. Also, in our recently published study, we found that ROS production were significantly higher in astrocytes daily-exposed (7 consecutive days) to static magnetic stimulation for 5 minutes, but not in astrocytes exposed to 15 minutes and 30 minutes [56]. In an overall view, lipid peroxidation may be related to the reduced viability and increased cell death observed in the stimulated groups. Also, the group stimulated for 40 min, which had a greater

increase in lipid peroxidation, showed a significant increase in membrane fluidity/cell death as well as a significant increase in the number of cells in G1 phase and a reduction in the number of cells in G2 phase. Other studies showed the effects of a magnetic field on oxidative stress and have observed variable results. An increase in lipid peroxidation in synaptosomes was observed in the brains of rats exposed to chronic SMF (1 mT – 50 continuous days) [66]. In the brains of rats exposed to a SMF with a strength of 128 mT 1 h/day for 5 days, no change in the activity of the CAT enzyme was observed, which was similar to our findings. However unlike us, these researchers did not find an increase in lipid peroxidation [67]. In contrast, Kabuto and colleagues evaluated the effects of a 1,5-300 mT SMF on TBARS accumulation in brain homogenates incubated with FeCl₃ and H₂O₂, and TBARS accumulation was inhibited when the brain homogenate incubated with FeCl₃ was exposed to a 2-4 mT SMF [68].

5 CONCLUSIONS

The present study mainly revealed that SMF can compromise cell viability in primary culture of astrocytes. Thus, further studies should be carried out to clarify the effects of astrocyte exposure to magnetic fields of different types, intensities and durations, as well as the mechanisms by which this physical agent affects cellular function. Moreover, there is variability in the results of different studies on the biological effects of magnetic fields due to the use of different parameters and multiple experimental variables. Astrocytes are tightly integrated with neural networks, acting within the context of neural tissue and demonstrating remarkable adaptive plasticity that supports the function of the CNS while maintaining the molecular homeostasis of the CNS environment [61]. In conclusion, this study is of the utmost importance for understanding health/normal astrocytes' response to the static magnetic field stimulation

since this therapeutic approach has been largely used against neurological and psychiatric pathologies. Here, we intend to introduce new insights from basic research that can be useful for therapeutic application since understanding cell behavior or cell response to static magnetic field stimulation could help to improve the treatment for brain diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Biotério Central da UFPel, to Laboratório de Virologia e Imunologia da UFPel (LabVir), to Laboratorio de Bioquímica da UFRGS, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- Brasil (CNPq) and HCPA Biomedical Engineering Laboratory.

REFERENCES

- [1] Fregni F, Boggio PS, Brunoni A. Neuromodulação Terapêutica: Princípios e Avanços da Estimulação Cerebral Não Invasiva em Neurologia, Reabilitação, Psiquiatria e Neuropsicologia. primeira. São Paulo: Sarvier; 2012.
- [2] Zorzo C, Higarza SG, Méndez M, Martínez JA, Pernía AM, Arias JL. High frequency repetitive transcranial magnetic stimulation improves neuronal activity without affecting astrocytes and microglia density. *Brain Res Bull* 2019;150:13–20. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.05.004>.
- [3] Oliviero A, Mordillo-Mateos L, Arias P, Panyavin I, Foffani G, Aguilar J. Transcranial static magnetic field stimulation of the human motor cortex. *J Physiol* 2011;589:4949–58. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.211953>.
- [4] Kufner M, Brückner S, Kammer T. No modulatory effects by transcranial static magnetic field stimulation of human motor and somatosensory cortex. *Brain Stimul* 2017;10:703–10. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2017.03.001>.
- [5] Loo CK, McFarquhar TF, Mitchell PB. A review of the safety of repetitive transcranial magnetic stimulation as a clinical treatment for depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 2008;11:131–47. <https://doi.org/10.1017/S1461145707007717>.
- [6] Ridding MC, Rothwell JC. Is there a future for therapeutic use of transcranial magnetic stimulation? *Nat Rev Neurosci* 2007;8:559–67. <https://doi.org/10.1038/nrn2169>.
- [7] Stock M, Kirchner B, Waibler D, Cowley DE, Pfaffl MW, Kuehn R. Effect of magnetic stimulation on the gene expression profile of in vitro cultured neural cells. *Neurosci Lett* 2012;526:122–7. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.08.024>.
- [8] Peterchev A V., Wagner TA, Miranda PC, Nitsche MA, Paulus W, Lisanby SH, et al.

Fundamentals of transcranial electric and magnetic stimulation dose: Definition, selection, and reporting practices. *Brain Stimul* 2012;5:435–53.

<https://doi.org/10.1016/j.brs.2011.10.001>.

- [9] Lozano-Soto E, Soto-León V, Sabbarese S, Ruiz-Alvarez L, Sanchez-del-Rio M, Aguilar J, et al. Transcranial static magnetic field stimulation (tSMS) of the visual cortex decreases experimental photophobia. *Cephalalgia* 2018;38:1493–7.
<https://doi.org/10.1177/0333102417736899>.
- [10] Bodega G, Forcada I, Suárez I, Fernández B. Acute and chronic effects of exposure to a 1-mT magnetic field on the cytoskeleton, stress proteins, and proliferation of astroglial cells in culture. *Environ Res* 2005;98:355–62. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2004.12.010>.
- [11] Cullen CL, Young KM. How Does Transcranial Magnetic Stimulation Influence Glial Cells in the Central Nervous System? *Front Neural Circuits* 2016;10:1–10.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00026>.
- [12] Cappon D, Jahanshahi M, Bisiacchi P. Value and efficacy of transcranial direct current stimulation in the cognitive rehabilitation: A critical review since 2000. *Front Neurosci* 2016;10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00157>.
- [13] Im SH, Yu JH, Park ES, Lee JE, Kim HO, Park KI, et al. Induction of striatal neurogenesis enhances functional recovery in an adult animal model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Neuroscience* 2010;169:259–68.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.04.038>.
- [14] Kamida T, Kong S, Eshima N, Abe T, Fujiki M, Kobayashi H. Transcranial direct current stimulation decreases convulsions and spatial memory deficits following pilocarpine-induced status epilepticus in immature rats. *Behav Brain Res* 2011;217:99–103.

- <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.08.050>.
- [15] Verkhatsky A, Zorec R, Parpura V. Stratification of astrocytes in healthy and diseased brain. *Brain Pathol* 2017;27:629–44. <https://doi.org/10.1111/bpa.12537>.
- [16] Akdemir ES, Huang AY, Deneen B. Astrocytogenesis : where , when , and how. *F1000Research* 2020;9.
- [17] Bramanti V, Tomassoni D, Avitabile M, Amenta F, Avola R. Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. *Front Biosci* 2010:558–70.
- [18] Clarke D, Penrose MA, Penstone T, Fuller-Carter PI, Hool LC, Harvey AR, et al. Frequency-specific effects of repetitive magnetic stimulation on primary astrocyte cultures. *Restor Neurol Neurosci* 2017;35:557–69. <https://doi.org/10.3233/RNN-160708>.
- [19] Khakh BS, Sofroniew M V. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat Neurosci* 2015;18:942–52. <https://doi.org/10.1038/nn.4043>.
- [20] Lange SC, Bak LK, Waagepetersen HS, Schousboe A, Norenberg MD. Primary cultures of astrocytes: Their value in understanding astrocytes in health and disease. *Neurochem Res* 2012;37:2569–88. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0868-0>.
- [21] Rodnight RB, Gottfried C. Morphological plasticity of rodent astroglia. *J Neurochem* 2013;124:263–75. <https://doi.org/10.1111/jnc.12087>.
- [22] Khodarahmi I, Mobasheri H, Firouzi M. The effect of 2.1 T static magnetic field on astrocyte viability and morphology. *Magn Reson Imaging* 2010;28:903–9. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2010.03.003>.
- [23] Buemi M, Di G, Floccari F. Cell Proliferation / Cell Death Balance in Renal Cell Cultures after Exposure to a Static Magnetic Field. *Nephron* 2001;87:269–73. <https://doi.org/10.1159/000045925>.

- [24] Chan P, Eng LF, Lee YL, Lin VW. Effects of pulsed magnetic stimulation of GFAP levels in cultured astrocytes. *J Neurosci Res* 1999;55:238–44.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990115\)55:2<238::AID-JNR11>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990115)55:2<238::AID-JNR11>3.0.CO;2-T)
[pii].
- [25] Nakamichi N, Ishioka Y, Hirai T, Ozawa S, Tachibana M, Nakamura N, et al. Possible promotion of neuronal differentiation in fetal rat brain neural progenitor cells after sustained exposure to static magnetism. *J Neurosci Res* 2009;87:2406–17.
<https://doi.org/10.1002/jnr.22087>.
- [26] Schildge S, Bohrer C, Beck K, Schachtrup C. Isolation and Culture of Mouse Cortical Astrocytes. *J Vis Exp* 2013:1–7. <https://doi.org/10.3791/50079>.
- [27] Funchal C, Dani C. *Neurociências: Modelos experimentais em animais*. Porto Alegre: Editora Universitária Metodista IPA : EDIPUCRS; 2014.
- [28] Galland F, Seady M, Taday J, Smaili SS, Gonçalves CA, Leite MC. Astrocyte culture models: Molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells. *Neurochem Int* 2019;131.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104538>.
- [29] Lasič E, Galland F, Vardjan N, Šribar J, Križaj I, Leite MC, et al. Time-dependent uptake and trafficking of vesicles capturing extracellular S100B in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 2016:309–23. <https://doi.org/10.1111/jnc.13754>.
- [30] Medeiros HR, Assumpcao JAF, Medeiros LF, Stapenhorst M, Nunes L, Henckes NAC, et al. Static Magnetic Stimulation Induces Cell-type Specific Alterations in the Viability of SH-SY5Y Neuroblastoma Cell Line. *Anticancer Res* 2020;40:5151–8.
<https://doi.org/10.21873/anticanres.14518>.

- [31] Cantello R, Rossi S, Varrasi C, Olivelli M, Civardi C, Bartalini S, et al. Slow repetitive TMS for drug-resistant epilepsy: Clinical and EEG findings of a placebo-controlled trial. *Epilepsia* 2007;48:366–74. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00938.x>.
- [32] Fregni F, Boggio PS, Valle AC, Rocha RR, Duarte J, Ferreira MJL, et al. A sham-controlled trial of a 5-day course of repetitive transcranial magnetic stimulation of the unaffected hemisphere in stroke patients. *Stroke* 2006;37:2115–22. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000231390.58967.6b>.
- [33] Fregni F, Otachi PTM, Do Valle A, Boggio PS, Thut G, Rigonatti SP, et al. A randomized clinical trial of repetitive transcranial magnetic stimulation in patients with refractory epilepsy. *Ann Neurol* 2006;60:447–55. <https://doi.org/10.1002/ana.20950>.
- [34] Joo EY, Han SJ, Chung SH, Cho JW, Seo DW, Hong SB. Antiepileptic effects of low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation by different stimulation durations and locations. *Clin Neurophysiol* 2007;118:702–8. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2006.11.008>.
- [35] Barile FA. *Introduction to in vitro cytotoxicology: mechanisms and methods*. 1994.
- [36] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [37] Meira Martins LA, Vieira MQ, Ilha M, de Vasconcelos M, Biehl HB, Lima DB, et al. The Interplay Between Apoptosis, Mitophagy and Mitochondrial Biogenesis Induced by Resveratrol Can Determine Activated Hepatic Stellate Cells Death or Survival. *Cell Biochem Biophys* 2015;71:657–72. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0245-5>.
- [38] Agnello M, Morici G, Rinaldi AM. A method for measuring mitochondrial mass and

- activity. *Cytotechnology* 2008;56:145–9. <https://doi.org/10.1007/s10616-008-9143-2>.
- [39] Peterson GL. Review of the folin phenol protein quantitation method of lowry, rosebrough, farr and randall. *Anal Biochem* 1979;100:201–20. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90222-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90222-7).
- [40] Steckler D, Stout TAE, Durandt C, Nöthling JO. Validation of merocyanine 540 staining as a technique for assessing capacitation-related membrane destabilization of fresh dog sperm. *Theriogenology* 2015;83:1451–60. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.01.019>.
- [41] Pedra NS, De Cássia Araújo Galdino K, Da Silva DS, Ramos PT, Bona NP, Soares MSP, et al. Endophytic fungus isolated from *Achyrocline satureioides* exhibits selective antiglioma activity-the role of sch-642305. *Front Oncol* 2018;8:1–20. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00476>.
- [42] Viau CM, Moura DJ, Facundo VA, Saffi J. The natural triterpene 3 β ,6 β ,16 β -trihydroxy-lup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* induces apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *BMC Complement Altern Med* 2014;14:1–12. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-280>.
- [43] Valiron O, Peris L, Rikken G, Schweitzer A, Saoudi Y, Remy C, et al. Cellular disorders induced by high magnetic fields. *J Magn Reson Imaging* 2005;22:334–40. <https://doi.org/10.1002/jmri.20398>.
- [44] Amado LL, Garcia ML, Ramos PB, Freitas RF, Zafalon B, Ferreira JLR, et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci Total Environ* 2009;407:2115–23. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038>.

- [45] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzimol* 1984;105:121–6.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- [46] Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170–5.
- [47] Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2001;302:141–5. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01636-6).
- [48] Federici G, Shaw BJ, Handy RD. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat Toxicol* 2007;84:415–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009>.
- [49] Ben Haim L, Rowitch DH. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci* 2016;18:31–41. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.159>.
- [50] Emsley JG, Macklis JD. Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glial Biol* 2006;2:175–86.
<https://doi.org/10.1021/nl061786n.Core-Shell>.
- [51] Bayraktar OA, Fuentealba LC, Alvarez-Buylla A, Rowitch DH. Astrocyte development and heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;7.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020362>.
- [52] Colbert AP, Souder J, Markov M. Static magnetic field therapy: Methodological challenges to conducting clinical trials. *Environmentalist* 2009;29:177–85.
<https://doi.org/10.1007/s10669-008-9203-3>.
- [53] Calabrò E, Magazù S, Currò M, Ientile R. The inverse relation between mitochondrial transmembrane potential and proteins α -helix in neuronal-like cells under static magnetic

- field and the role of VDAC. *Electromagn Biol Med* 2020;8378.
<https://doi.org/10.1080/15368378.2020.1737808>.
- [54] Mohammadi F, Ghanati F, Sharifi M. On the mechanism of the cell cycle control of suspension-cultured tobacco cells after exposure to static magnetic field. *Plant Sci* 2018.
- [55] Sadri M, Abdolmaleki P, Abrun S, Beiki B, Samani FS. Static Magnetic Field Effect on Cell Alignment, Growth, and Differentiation in Human Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Mol Bioeng* 2017;10:249–62. <https://doi.org/10.1007/s12195-017-0482-y>.
- [56] Costa CC, Ramos JMO, Helena ES, Pedra NS, Martins LAM, Sanches PRS, et al. Morphological and biochemical analysis of astrocytes in primary culture under static magnetic stimulation. *Brazilian J Dev* 2020;6:20884–95.
<https://doi.org/10.34117/bjdv6n4-312>.
- [57] Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* 2006;1:1112–6. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>.
- [58] Kim SC, Im W, Shim JY, Kim SK, Kim BJ. Static magnetic field controls cell cycle in cultured human glioblastoma cells. *Cytotechnology* 2016;68:2745–51.
<https://doi.org/10.1007/s10616-016-9973-2>.
- [59] Potenza L, Martinelli C, Polidori E, Zeppa S, Calcabrini C, Stocchi L, et al. Effects of a 300 mT static magnetic field on human umbilical vein endothelial cells. *Bioelectromagnetics* 2010;31:630–9. <https://doi.org/10.1002/bem.20591>.
- [60] Hirai T, Taniura H, Goto Y, Tamaki K, Oikawa H, Kambe Y, et al. Counteraction by repetitive daily exposure to static magnetism against sustained blockade of N-methyl-D-aspartate receptor channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 2005;80:491–500. <https://doi.org/10.1002/jnr.20497>.

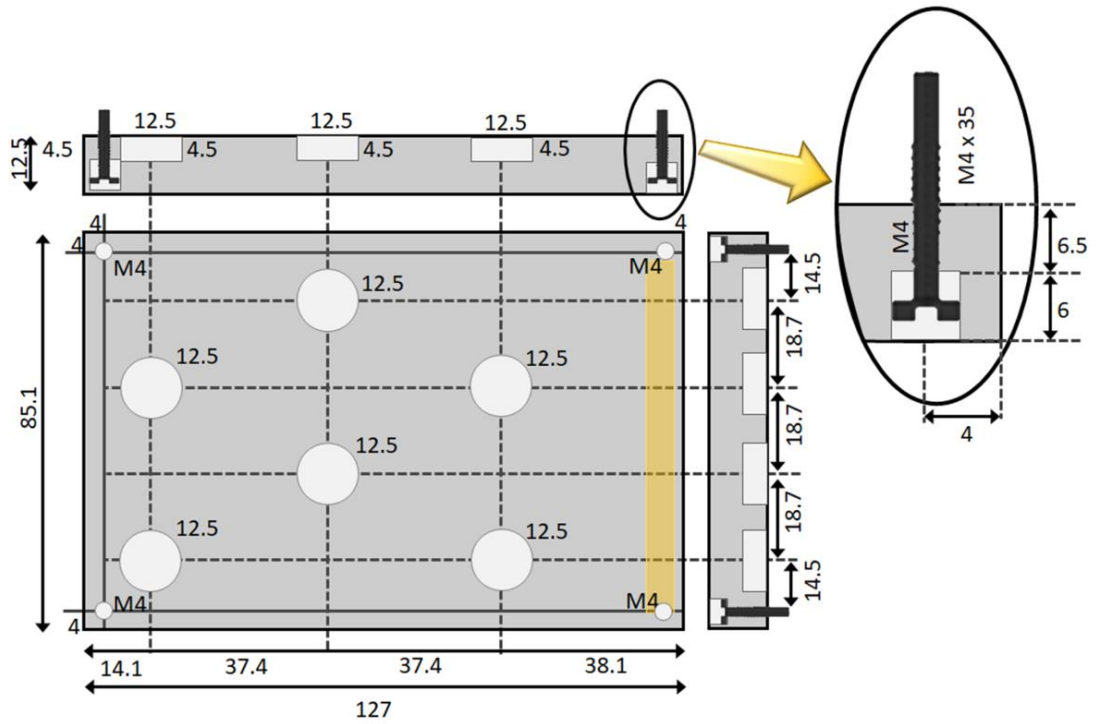
- [61] Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of astroglia. *Physiol Rev* 2018;98:239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>.
- [62] Bulthuis EP, Adjobo-Hermans MJW, Willems PHGM, Koopman WJH. Mitochondrial Morphofunction in Mammalian Cells. vol. 30. 2019. <https://doi.org/10.1089/ars.2018.7534>.
- [63] Meyer JN, Leuthner TC, Luz AL. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity Submitted for consideration for the Special Issue of Toxicology on "Chemical Mitochondrial Toxicity. *Toxicology* 2017:100–6. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.03.011>.
- [64] Bolaños JP. Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. *J Neurochem* 2016;139:115–25. <https://doi.org/10.1111/jnc.13486>.
- [65] McBean GJ. Cysteine, glutathione, and thiol redox balance in astrocytes. *Antioxidants* 2017;6:1–13. <https://doi.org/10.3390/antiox6030062>.
- [66] Dinčić M, Krstić DZ, Čolović MB, Nešović Ostojić J, Kovačević S, De Luka SR, et al. Modulation of rat synaptosomal ATPases and acetylcholinesterase activities induced by chronic exposure to the static magnetic field. *Int J Radiat Biol* 2018;94:1062–71. <https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1518611>.
- [67] Ghodbane S, Ammari M, Lahbib A, Sakly M, Abdelmelek H. Static magnetic field exposure–induced oxidative response and caspase-independent apoptosis in rat liver: effect of selenium and vitamin E supplementations. *Environ Sci Pollut Res* 2015;22:16060–6. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4802-2>.
- [68] Kabuto H, Yokoi I, Ogawa N, Mori A, Liburdy RP. Effects of magnetic fields on the accumulation of thiobarbituric acid reactive substances induced by iron salt and H₂O₂ in

mouse brain homogenates or phosphatidylcholine. *Pathophysiology* 2001;7:283–8.

[https://doi.org/10.1016/S0928-4680\(00\)00062-6](https://doi.org/10.1016/S0928-4680(00)00062-6).

FIGURE LEGENDS

a)



b)

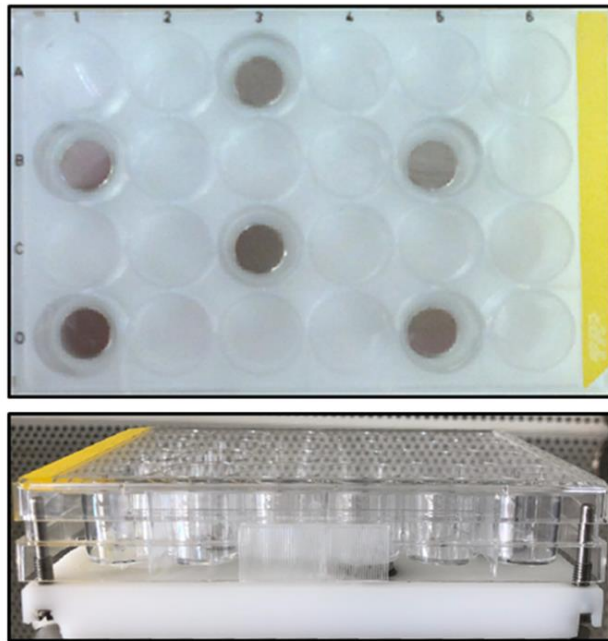


Fig. 1. Static magnetic stimulation device. (a) Schematic representation of 24-well plate above the device; (b) Top view and lateral view of 24-well plate above the apparatus

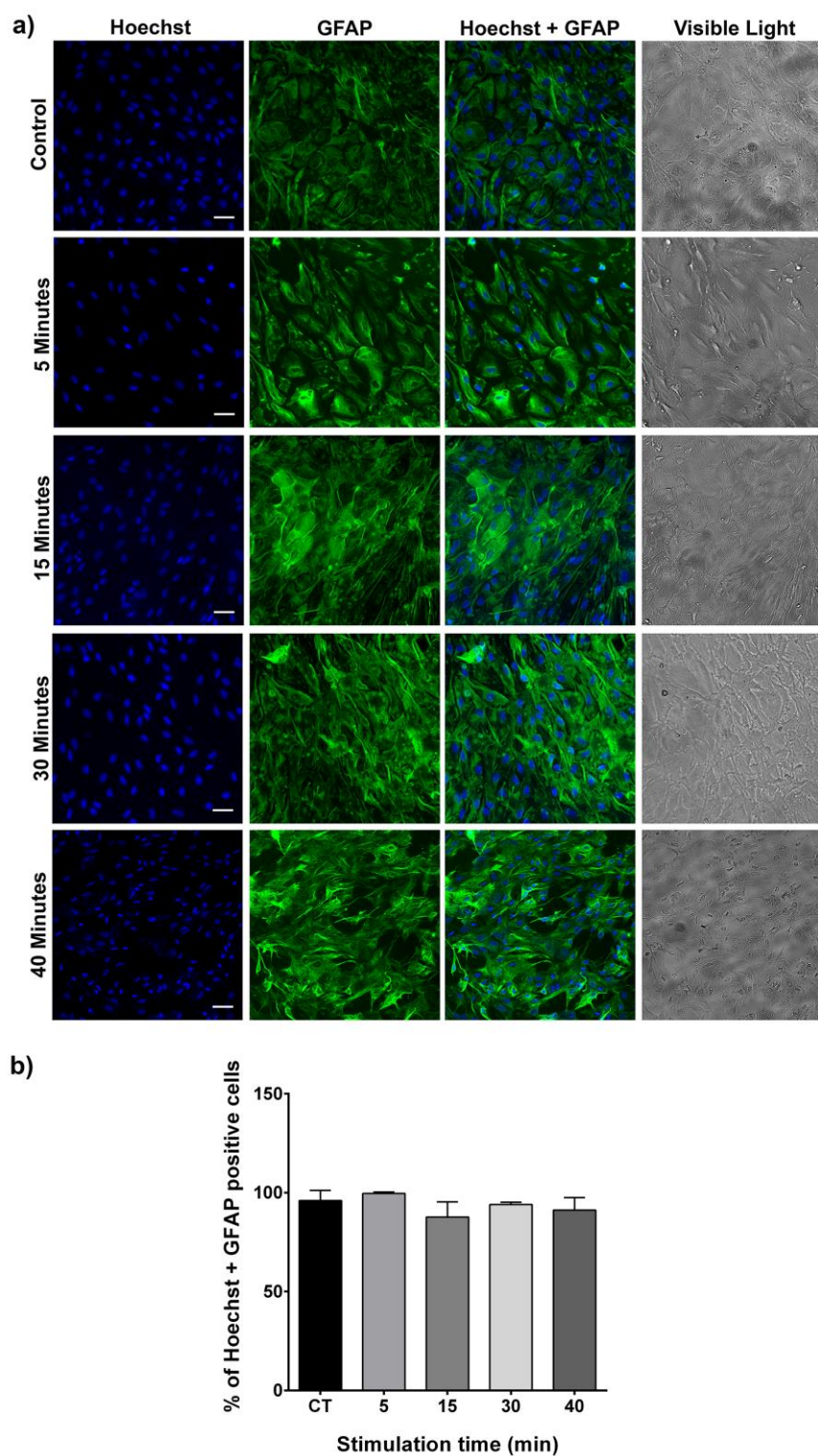


Fig. 2. Images of fluorescence microscopy revealed that primary culture of astrocytes was successful and homogenous. Scale bar: 20 μ M (a) Imaging quantification revealed that approximately 90% of cells are GFAP-Hoechst positive (b).

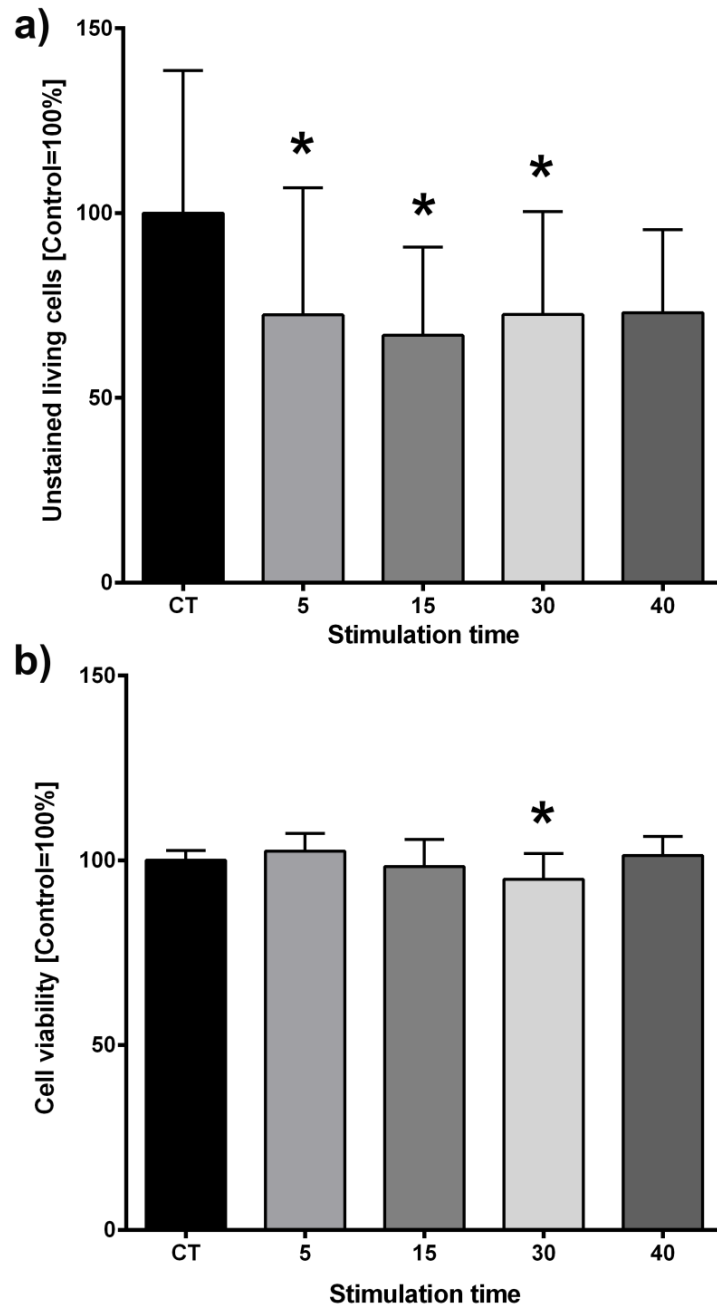


Fig. 3. Effect of a SMF in the astrocyte viability after daily SMF exposition of 5 min, 15 min, 30 min and 40 min during 7 consecutive days. Through excluding Trypan positive cells, we found that living cells was significantly reduced after 5, 15, and 30 minutes of SMF exposition ($p=0.013$, $p=0.001$, and $p=0.013$, respectively) (a). Through MTT assay, we found that cell metabolism was only significantly reduced after 30 minutes of SMF exposition ($p=0.0032$) (b). Data are expressed as the mean \pm SD, * $p < 0.05$ versus control. Control =100%.

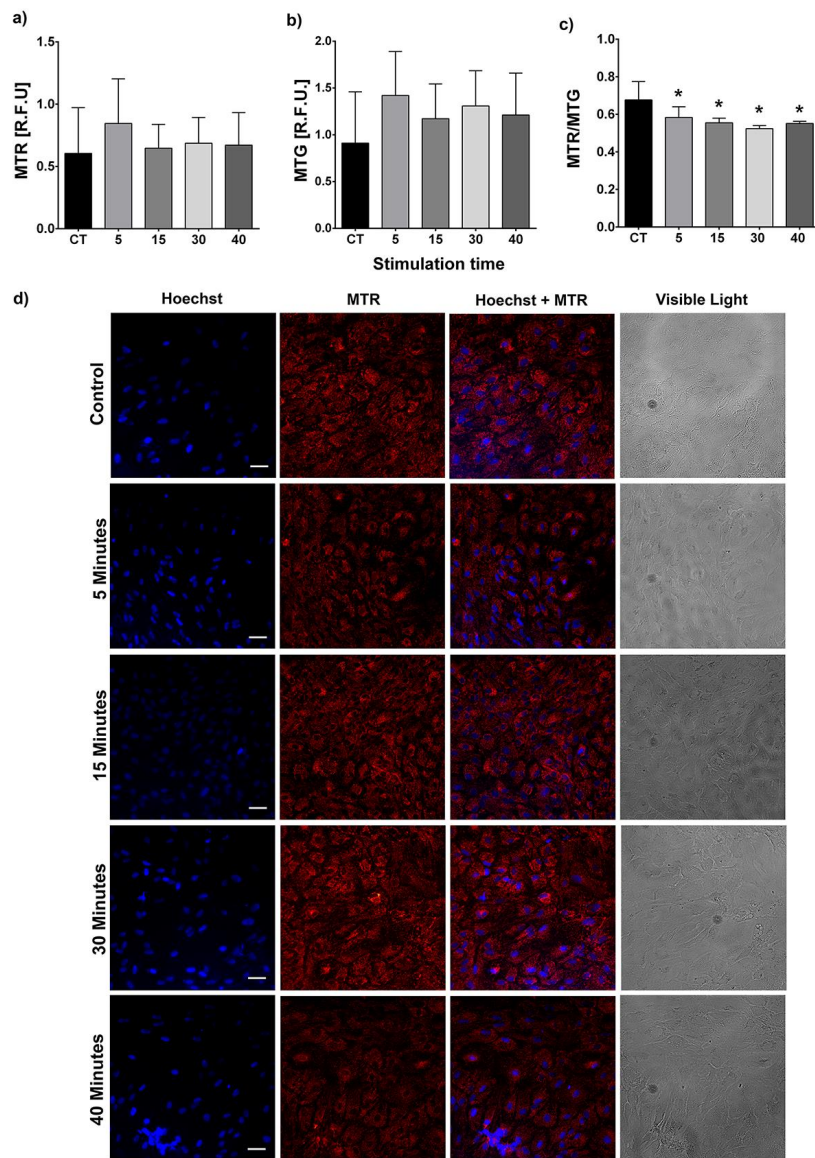


Fig. 4 Determination of mitochondrial activity and mass by Mitotracker Red (MTR) and Green (MTG). Individually, there was no significant differences among groups regarding mitochondrial activity (a) and mass (b). When established the MTR/MTG ratio, it was revealed that all stimulated cells presented a decrease consistent with mitochondrial loss of function ($p=0.041$, $p=0.004$, $p=0.0003$ and $p=0.003$, respectively) (c). Although we recognize that more investigation would be helpful on investigating mitochondrial morphology, no apparently differences were visualized through fluorescence microscopy: all groups presented mitochondrial network distributed along cell cytoplasm. Scale bar: 20 μ M (d). Data are expressed as the mean \pm SD. * $p<0.05$ versus control.

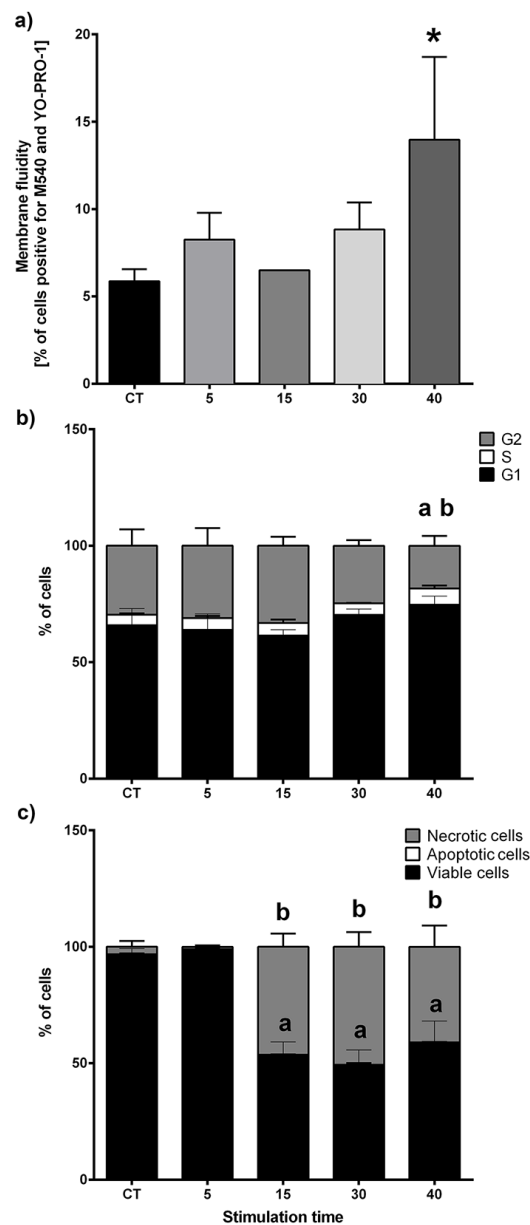


Fig. 5. Cells positive for M540 and Yo-PRO-1 revealed that 40 min-stimulated cells presented an increase in Membrane fluidity and stained nucleus consistent with loss of viability ($p < 0.0001$) (a). There was a significant increase in the G1 cell population as well as a reduction in the G2 cell population in the 40 min stimulated group (a, $p = 0.0407$ and b, $p = 0.0018$, respectively) (b). There was an increase in the percentage of necrotic cells in the 15, 30 and 40 min stimulated groups (a, $p < 0.0001$) with a consequent reduction of living cells (b, $p < 0.0001$) (c). Data are expressed as the mean \pm SD.

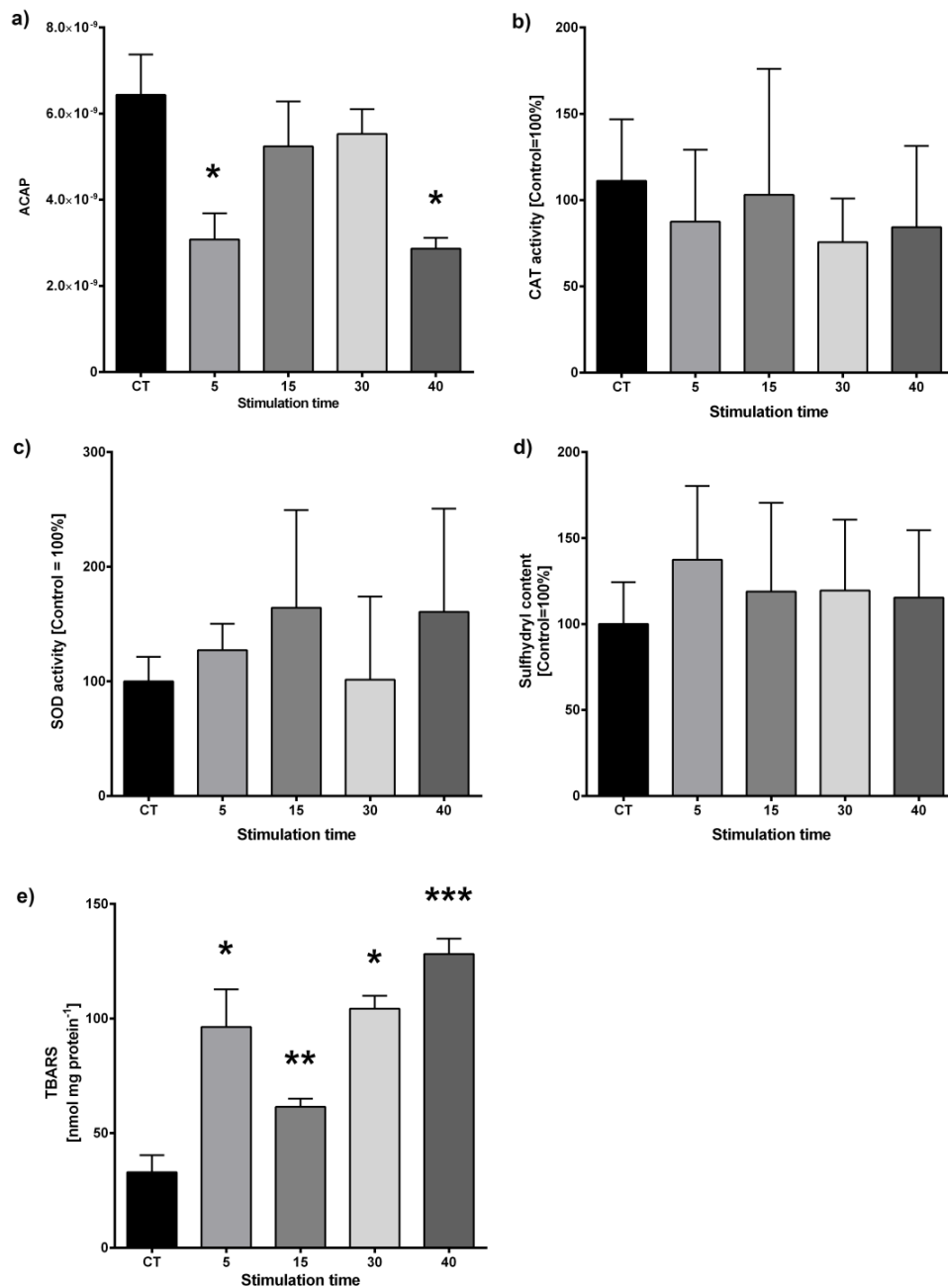


Fig. 6. Effect of a SMF on antioxidant and oxidative stress profiles of stimulated astrocyte. There was a significant reduction of antioxidant capacity (ACAP) in the 5- and 40-min stimulated groups ($p < 0.0001$) (a). There were no significant differences among groups regarding the CAT (b) and SOD (c) enzyme activity, and the total thiol content (d). There was an increase of lipid peroxidation in all stimulated groups (e). Data are expressed as the mean \pm SD.

5 Considerações finais:

Podemos concluir que existe uma grande variedade de tipos de estimulação magnética utilizadas para tratamento complementar de diversas patologias, e que os resultados terapêuticos dependem da frequência, intensidade, tempo de exposição, dinâmica e célula em questão. Os resultados obtidos no presente estudo (Tabela 1) revelaram que a estimulação magnética estática de 305mT por 5min, 15min, 30min e 40min diários por 7 dias consecutivos reduziram a viabilidade de astrócitos corticais de ratos Wistar em cultivo primário. Também pode-se inferir que houve uma redução na relação função/massa mitocondrial em todos os tempos de estimulação, o que demonstra uma disfunção mitocondrial causada pelo campo magnético independente do tempo de estímulo, mesmo não havendo alteração morfológica mitocondrial. Além disso, foi observado um aumento substancial de morte celular nos tempos de 15min, 30min e 40min, possivelmente por necrose, uma vez que, a porcentagem de apoptose precoce foi pequena. Quanto as análises relacionadas aos parâmetros de estresse oxidativo e perfil antioxidante pode-se dizer que houve um aumento da peroxidação lipídica em todos os tempos analisados e uma redução na capacidade antioxidante total nos grupos estimulados por 5min e 40min. As enzimas SOD e CAT não mostraram alterações e tampouco o conteúdo tiólico total. No entanto, no tempo 5min, as espécies reativas de oxigênio mostraram estar aumentadas. As células estimuladas por 40min apresentaram alterações mais proeminentes, pois ocorreu um aumento da fluidez de membrana e uma retenção de células na fase G1, seguido da redução do número de células na fase G2 do ciclo. No ensaio Sulforodamina B as células estimuladas por 5min e 15min apresentaram um aumento na absorvância, demonstrando possivelmente uma maior densidade celular, fato que se contrapõe aos demais experimentos realizados. Uma explicação pode ser o fato dela ter superestimado o número celular por corar frações proteicas correspondentes a debris celulares ou ainda por não necessitar de uma reação metabólica (BANASIAK *et al.*, 1999; KEEPERS *et al.*, 1991).

	5 min	15 min	30 min	40 min
Trypan	↓ n ^o céls. vivas	↓ n ^o céls. vivas	↓ n ^o céls. vivas	-----
MTT	-----	-----	↓ viab. cel.	-----
MTR/MTG	↓	↓	↓	↓
Fluidez de membrana	-----	-----	-----	↑
Ciclo celular	-----	-----	-----	↑ fase G1 ↓ fase G2
Annexin/PI	-----	↑ Necrose	↑ Necrose	↑ Necrose
ACAP	↓	-----	-----	↓
TBARS	↑	↑	↑	↑
CAT/SOD/Cont. Tiólico	-----	-----	-----	-----

Tabela 1: Resumo dos resultados

Os mecanismos exatos pelos quais ocorreram as alterações observadas nos astrócitos obtidos por cultura primária, precisam ser mais profundamente investigados, já que existe uma necessidade de buscar padrões ideais de tempo e intensidade de estimulação magnética no tratamento das diferentes patologias neurológicas.

5.1 Limitações

É necessário cuidado ao extrapolar os resultados para organismos vivos, já que a cultura primária de astrócitos, é um modelo *in vitro*, não representando completamente os eventos complexos que ocorrem *in vivo*. A resposta celular individual (cultura monotípica) é diferente da resposta celular no seu meio fisiológico, onde ocorre uma forte interação entre as células do SNC. Com isso, surge a necessidade de verificar se a resposta de alguns parâmetros estudados também ocorre *in vivo*;

5.2 Perspectivas

- Avaliar se a disfunção mitocondrial é mediada pelas espécies reativas de oxigênio
- Avaliar expressão da caspase-9, citocromo C, proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas

Esperamos que nosso estudo tenha dado sua contribuição para que a comunidade científica possa utilizar-se dele para chegar a algumas respostas mais consistentes.

Referências:

- AARON, R. K. *et al.* Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. **Clinical orthopaedics and related research**, 2004. n. 419, p. 30–37.
- AKDEMIR, E. S.; HUANG, A. Y.; DENEEN, B. Astrocytogenesis : where , when , and how. **F1000Research**, 2020. v. 9.
- AMARA, S. *et al.* Effects of static magnetic field exposure on antioxidative enzymes activity and DNA in rat brain. **General physiology and biophysics**, 2009. v. 28, p. 260–265.
- ANDERSON, C.; SWANSON, R. Astrocyte Glutamate Transport : Review of Properties , Regulation , and Physiological Functions. **Glia**, 2000. v. 32, n. May, p. 1–14.
- ARAQUE, A. *et al.* Tripartite synapses : glia , the unacknowledged partner. **TINS**, 1999. v. 22, n. 5, p. 207–214.
- BANASIAK, D. *et al.* Comparison between the clonogenic, MTT, and SRB assays for determining radiosensitivity in a panel of human bladder cancer cell lines and a ureteral cell line. **Radiation Oncology Investigations**, 1999. v. 7, n. 2, p. 77–85.
- BARKER, A. T.; JALINOUS, R.; FREESTON, I. L. Non-invasive Magnetic Stimulation of Human Motor Cortex. **The Lancet**, 1985. v. 11, p. 1106–1107.
- BARRETO, R. A. . *et al.* O alcalóide monocrotalina , extraído de *Crotalaria retusa* , altera a expressão de GFAP , a morfologia e o crescimento de culturas primárias de astrócitos . **Revista Brasileira de Saúde**, 2006. v. 7, n. 2, p. 112–127. Disponível em: <<http://www.rbspa.ufba.br>>.
- BASS, N. H. *et al.* Quantitative cytoarchitectonic distribution of neurons, glia, and DNA in rat cerebral cortex. **Journal of Comparative Neurology**, 1971. v. 143, n. 4, p. 481–490.
- BODEGA, G. *et al.* Acute and chronic effects of exposure to a 1-mT magnetic field on the cytoskeleton, stress proteins, and proliferation of astroglial cells in culture. **Environmental Research**, 2005. v. 98, n. 3, p. 355–362.
- BRAMANTI, V. *et al.* Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. **frontiers in bioscience**, 2010. p. 558–570.
- BRUNONI, A. R. *et al.* The Sertraline vs Electrical Current Therapy for Treating Depression Clinical Study. **JAMA Psychiatry**, 2013. v. 70, n. 4, p. 383. Disponível em: <<http://archpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/2013.jamapsychiatry.32>>.
- BUEMI, M.; DI, G.; FLOCCARI, F. Cell Proliferation / Cell Death Balance in Renal Cell Cultures after Exposure to a Static Magnetic Field. **Nephron**, 2001. v. 87, p.

269–273.

CABEZAS, R. *et al.* Growth Factors and Astrocytes Metabolism: Possible Roles for Platelet Derived Growth Factor. **Medicinal Chemistry**, 2016. v. 12, n. 3, p. 204–210.

CALABRESE, E. J.; MATTSON, M. P. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? **npj Aging and Mechanisms of Disease**, 2017. v. 3, n. 1, p. 1–8.

CAPPON, D.; JAHANSHAH, M.; BISIACCHI, P. Value and efficacy of transcranial direct current stimulation in the cognitive rehabilitation: A critical review since 2000. **Frontiers in Neuroscience**, 2016. v. 10, n. APR.

CHAN, P. *et al.* Effects of pulsed magnetic stimulation of GFAP levels in cultured astrocytes. **J Neurosci Res**, 1999. v. 55, n. 2, p. 238–244. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9972826>.

CHEN, R. *et al.* Transcranial magnetic stimulation for the treatment of epilepsy (Review) SUMMARY OF FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON. 2016. n. 8.

CHIONNA, A. *et al.* Cell shape and plasma membrane alterations after static magnetic fields exposure. **European Journal of Histochemistry**, 2003. v. 47, n. 4, p. 299–308.

CHWISTEK, M. Recent advances in understanding and managing cancer pain. **F1000Research**, 2017. v. 6, n. 0, p. 1–10.

CLARKE, D. *et al.* Frequency-specific effects of repetitive magnetic stimulation on primary astrocyte cultures. **Restorative Neurology and Neuroscience**, 2017. v. 35, n. 6, p. 557–569.

COLBERT, A. P.; SOUDER, J.; MARKOV, M. Static magnetic field therapy: Methodological challenges to conducting clinical trials. **Environmentalist**, 2009. v. 29, n. 2 SPEC. ISS., p. 177–185.

CULLEN, C. L.; YOUNG, K. M. How Does Transcranial Magnetic Stimulation Influence Glial Cells in the Central Nervous System? **Frontiers in Neural Circuits**, 2016. v. 10, n. April, p. 1–10. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fncir.2016.00026/abstract>>.

DENG, Z. De; LISANBY, S. H.; PETERCHEV, A. V. Electric field depth-focality tradeoff in transcranial magnetic stimulation: Simulation comparison of 50 coil designs. **Brain Stimulation**, 2013. v. 6, n. 1, p. 1–13.

DINČIĆ, M. *et al.* Modulation of rat synaptosomal ATPases and acetylcholinesterase activities induced by chronic exposure to the static magnetic field. **International Journal of Radiation Biology**, 2018. v. 94, n. 11, p. 1062–1071.

EMSLEY, J. G.; MACKLIS, J. D. Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. **Neuron Glial Biol**, 2006. v. 2, n. 3, p. 175–186.

ENG, Lawrence F; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Yuen L. Glial Fibrillary Acidic Protein : GFAP-Thirty-One Years (1969 – 2000)*. **Neurochemical Research**, 2000. v. 25, p. 1439–1451.

FACCI, L.; SKAPER, S. **Neurotrophic Factors: Methods and Protocols**. [S.l.]: [s.n.], 2019. V. 1727.

FANG, Z. *et al.* Magnetic Stimulation Influences Injury-Induced Migration of White Matter Astrocytes. **Electromagnetic Biology and Medicine**, 2010. v. 29, p. 113–121.

FATEMI-ARDEKANI, A. **Transcranial magnetic stimulation: Physics, electrophysiology, and applications**. [S.l.]: [s.n.], 2008. V. 36.

FERREIRA-CRAVO, M. *et al.* Antioxidant responses and reactive oxygen species generation in different body regions of the estuarine polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae). **Chemosphere**, 2007. v. 66, n. 7, p. 1367–1374.

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.

FUNCHAL, C.; DANI, C. **Neurociências: Modelos experimentais em animais**. Porto Alegre: Editora Universitária Metodista IPA : EDIPUCRS, 2014.

GEORGE, M. S.; ASTON-JONES, G. Noninvasive techniques for probing neurocircuitry and treating illness: Vagus nerve stimulation (VNS), transcranial magnetic stimulation (TMS) and transcranial direct current stimulation (tDCS). **Neuropsychopharmacology**, 2010. v. 35, n. 1, p. 301–316.

GHODBANE, S. *et al.* Bioeffects of static magnetic fields: Oxidative stress, genotoxic effects, and cancer studies. **BioMed Research International**, 2013. v. 2013.

_____ *et al.* Static magnetic field exposure–induced oxidative response and caspase-independent apoptosis in rat liver: effect of selenium and vitamin E supplementations. **Environmental Science and Pollution Research**, 2015. v. 22, n. 20, p. 16060–16066.

GOMES, F. C.A.; PAULIN, D.; NETO, V. M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): Modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 1999. v. 32, n. 5, p. 619–631.

GOMES, Flávia Carvalho Alcantara; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L. Glia: Dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avancados**, 2013. v. 27, n. 77, p. 61–84.

HAGHIGHAT, N.; MCCANDLESS, D. W.; GERAMINEGAD, P. Responses in primary astrocytes and C6-Glioma cells to ammonium chloride and dibutyryl cyclic-AMP. **Neurochemical Research**, 2000. v. 25, n. 2, p. 277–284.

HAIM, L. BEN; ROWITCH, D. H. Functional diversity of astrocytes in neural circuit

regulation. **Nature Reviews Neuroscience**, 2016. v. 18, n. 1, p. 31–41.

HALASSA, M. M. *et al.* Synaptic Islands Defined by the Territory of a Single Astrocyte. **Journal of Neuroscience**, 2007. v. 27, n. 24, p. 6473–6477. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.1419-07.2007>>.

HOFFMAN, R. E.; CAVUS, I.; PH, D. Slow Transcranial Magnetic Stimulation, Long-Term Depotentiation, and Brain Hyperexcitability Disorders Ralph. **Am J Psychiatry**, 2002. v. 159, p. 1093–1102.

HOUDAYER, E. *et al.* The effects of low- and high-frequency repetitive TMS on the input/output properties of the human corticospinal pathway. **Experimental Brain Research**, 2008. v. 187, n. 2, p. 207–217.

HUANG, Y. Z. *et al.* Theta burst stimulation of the human motor cortex. **Neuron**, 2005. v. 45, n. 2, p. 201–206.

IM, S. H. *et al.* Induction of striatal neurogenesis enhances functional recovery in an adult animal model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. **Neuroscience**, 2010. v. 169, n. 1, p. 259–268.

ISHII, T.; WARABI, E.; MANN, G. E. Circadian control of p75 neurotrophin receptor leads to alternate activation of Nrf2 and c-Rel to reset energy metabolism in astrocytes via brain-derived neurotrophic factor. **Free Radical Biology and Medicine**, 2018. v. 119, n. September 2017, p. 34–44.

ISHISAKA, R. *et al.* Effects of a magnetic fields on the various functions of subcellular organelles and cells. **Pathophysiology**, 2000. v. 7, n. 2, p. 149–152.

KAMIDA, T. *et al.* Transcranial direct current stimulation decreases convulsions and spatial memory deficits following pilocarpine-induced status epilepticus in immature rats. **Behavioural Brain Research**, 2011. v. 217, n. 1, p. 99–103.

KEEPERS, Y. P. *et al.* Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, 1991. v. 27, n. 7, p. 897–900.

KHODARAHMI, I.; MOBASHERI, H.; FIROUZI, M. The effect of 2.1 T static magnetic field on astrocyte viability and morphology. **Magnetic Resonance Imaging**, 2010. v. 28, n. 6, p. 903–909.

KIM, J. Y. *et al.* Attenuation of Spinal Cord Injury-Induced Astroglial and Microglial Activation by Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation in Rats. **Journal Korean Med Sci**, 2013. v. 28, p. 295–299.

KIM, S. C. *et al.* Static magnetic field controls cell cycle in cultured human glioblastoma cells. **Cytotechnology**, 2016. v. 68, n. 6, p. 2745–2751.

LAHBIB, Aïda *et al.* Vitamins and glucose metabolism: The role of static magnetic fields. **International Journal of Radiation Biology**, 2014. v. 90, n. 12, p. 1240–1245.

LANGE, S. C. *et al.* Primary cultures of astrocytes: Their value in understanding astrocytes in health and disease. **Neurochemical Research**, 2012. v. 37, n. 11, p. 2569–2588.

LEE, E. G. *et al.* Investigational Effect of Brain-Scalp Distance on the Efficacy of Transcranial Magnetic Stimulation Treatment in Depression. **IEEE Transactions on Magnetism**, 2016. v. 52, n. 7, p. 10–13.

LEE, J. Y. *et al.* Effects of low- and high-frequency repetitive magnetic stimulation on neuronal cell proliferation and growth factor expression: A preliminary report. **Neuroscience Letters**, 2015. v. 604, p. 167–172.

LENHOSSEK, M. V. Zur Kenntnis der Neuroglia des menschlichen Rückenmarkes. **verh. Anat. Ges**, 1891. v. 5, p. 193–221.

LOZANO-SOTO, E. *et al.* Transcranial static magnetic field stimulation (tSMS) of the visual cortex decreases experimental photophobia. **Cephalalgia**, 2018. v. 38, n. 8, p. 1493–1497.

MA, J. *et al.* Magnetic stimulation modulates structural synaptic plasticity and regulates BDNF – TrkB signal pathway in cultured hippocampal neurons. **Neurochemistry International**, 2013. v. 62, n. 1, p. 84–91. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2012.11.010>>.

MANZETTI, S.; JOHANSSON, O. Global electromagnetic toxicity and frequency-induced diseases: Theory and short overview. **Pathophysiology**, 2012. v. 19, n. 3, p. 185–191.

MATYASH, V.; KETTENMANN, H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. **Brain Research Reviews**, 2010. v. 63, n. 1–2, p. 2–10.

MENET, V. *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. **Journal of Neuroscience**, 2001. v. 21, n. 16, p. 6147–6158.

MEYER, J. F.; WOLF, B.; GROSS, G. W. Magnetic Stimulation and Depression of Mammalian Networks in Primary Neuronal Cell Cultures. **Biomedical Engineering, IEEE Transactions on**, 2009. v. 56, n. 5, p. 1512–1523.

MINIUSSI, C.; ROSSINI, P. M. Transcranial magnetic stimulation in cognitive rehabilitation. **Neuropsychological Rehabilitation**, 2011. v. 21, n. 5, p. 579–601.

MOHAMMADI, F.; GHANATI, F.; SHARIFI, M. On the mechanism of the cell cycle control of suspension-cultured tobacco cells after exposure to static magnetic field. **Plant Science**, 2018.

MÜLLER-DAHLHAUS, F.; VLACHOS, A. Unraveling the cellular and molecular mechanisms of repetitive magnetic stimulation. **Frontiers in molecular neuroscience**, 2013. v. 6, n. December, p. 1–7.

MULLER, M. B. *et al.* Long-Term Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Increases the Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Cholecystinin

mRNA, but not Neuropeptide Tyrosine mRNA in Specific Areas of Rat Brain. **Neuropsychopharmacology**, 2000. v. 23, n. 2, p. 205–215.

NAKAMICHI, N. *et al.* Possible promotion of neuronal differentiation in fetal rat brain neural progenitor cells after sustained exposure to static magnetism. **Journal of Neuroscience Research**, 2009. v. 87, n. 11, p. 2406–2417.

NAVARRETE, M. *et al.* Astrocyte calcium signal and gliotransmission in human brain tissue. **Cerebral Cortex**, 2013. v. 23, n. 5, p. 1240–1246.

NOOHI, S.; AMIRSALARI, S. History, Studies and Specific Uses of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) in Treating Epilepsy. **Iran J Child Neurolo**, 2016. v. 10, n. 1, p. 1–8. Disponível em: <<http://insights.ovid.com/crossref?an=00001648-201609000-00021>>.

OHIRA, K. *et al.* Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices. **European Journal of Neuroscience**, 2007. v. 25, n. 2, p. 406–416.

PAIXÃO, S.; KLEIN, R. Neuron – astrocyte communication and synaptic plasticity. *nia Paixão and Rüdiger Klein.* **current Opinion in Neurobiology**, 2010. v. 20, p. 466–473.

PARADISI, S. *et al.* A 50-Hz magnetic field induces structural and biophysical changes in membranes. **Bioelectromagnetics**, 1993. v. 14, n. 3, p. 247–255.

PAUWELS, B. *et al.* Comparison of the sulforhodamine B assay and the clonogenic assay for in vitro chemoradiation studies. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 2003. v. 51, n. 3, p. 221–226.

PELLETIER, S. J. *et al.* The Morphological and Molecular Changes of Brain Cells Exposed to Direct Current Electric Field Stimulation. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, 2015. v. 18, n. 5, p. 1–16. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ijnp/article-lookup/doi/10.1093/ijnp/pyu090>>.

PRINA-MELLO, A. *et al.* Influence of strong static magnetic fields on primary cortical neurons. **Bioelectromagnetics**, 2006. v. 27, n. 1, p. 35–42.

RAMASWAMY, S.; KORDOWER, J. Are growth factors the answer? **Parkinsonism and related Disorders**, 2009. v. 15, p. S176–S180. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020\(09\)70810-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70810-7)>.

RAUS, S. *et al.* Response of Hippocampal Neurons and Glial Cells to Alternating Magnetic Field in Gerbils Submitted to Global Cerebral Ischemia. **Neurotox Res**, 2013. v. 23, p. 79–91.

RIDDING, M. C.; ROTHWELL, J. C. Is there a future for therapeutic use of transcranial magnetic stimulation? **Nat Rev Neurosci**, 2007. v. 8, n. 7, p. 559–567. Disponível em: <<http://dx.doi.org.ezproxy.bu.edu/10.1038/nrn2169>%5Cn<http://www.nature.com.ezproxy.bu.edu/nrn/journal/v8/n7/full/nrn2169.html>%5Cn<http://www.nature.com.ezproxy.bu.edu/nrn/journal/v8/n7/pdf/nrn2169.pdf>>.

RODNIGHT, R. B.; GOTTFRIED, C. Morphological plasticity of rodent astroglia. **Journal of Neurochemistry**, 2013. v. 124, n. 3, p. 263–275.

ROSEN, A. D. Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. **Cell Biochem Biophys**, 2003. v. 39, n. 2, p. 163–173. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14515021>>.

RUBINSTEIN, L. V. *et al.* Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, 1990. v. 82, n. 13, p. 1113–1117.

SADRI, M. *et al.* Static Magnetic Field Effect on Cell Alignment, Growth, and Differentiation in Human Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Cellular and Molecular Bioengineering**, 2017. v. 10, n. 3, p. 249–262.

SAITO, A. *et al.* Developmental effects of low frequency magnetic fields on P19-derived neuronal cells. **2009 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society**, 2009. p. 5942–5945. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/5334755/>>.

SCHILDGE, S. *et al.* Isolation and Culture of Mouse Cortical Astrocytes. **Journal of Visualized Experiments**, 2013. n. 71, p. 1–7. Disponível em: <<http://www.jove.com/video/50079/isolation-and-culture-of-mouse-cortical-astrocytes>>.

SHRODE-LD; PUTNAM-RW. Intracellular pH regulation in primary rat astrocytes and C6 glioma cells. **Glia.**, 1994. v. 12, p. 196–210.

SIMKO, M. Cell Type Specific Redox Status is Responsible for Diverse Electromagnetic Field Effects. **Current Medicinal Chemistry**, 2007. v. 14, n. 10, p. 1141–1152.

STERN, S. *et al.* External Excitation of Neurons Using Electric and Magnetic Fields in One- and Two-dimensional Cultures. **Journal of Visualized Experiments**, 2017. n. 123, p. 1–14. Disponível em: <<https://www.jove.com/video/54357/external-excitation-neurons-using-electric-magnetic-fields-one-two>>.

STOCK, M. *et al.* Effect of magnetic stimulation on the gene expression profile of in vitro cultured neural cells. **Neurosci Lett**, 2012. v. 526, n. 2, p. 122–127. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22925660>>.

SULLIVAN, K.; BALIN, A. K.; ALLEN, R. G. Effects of static magnetic fields on the growth of various types of human cells. **Bioelectromagnetics**, 2011. v. 32, n. 2, p. 140–147.

TANG, A.; THICKBROOM, G.; RODGER, J. Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation of the Brain : Mechanisms from Animal and Experimental Models. **The neuroscientist**, 2015.

TEODORI, L. *et al.* Static magnetic fields affect cell size, shape, orientation, and membrane surface of human glioblastoma cells, as demonstrated by electron, optic,

and atomic force microscopy. **Cytometry Part A**, 2006. v. 69, n. 2, p. 75–85.

THIELSCHER, A.; KAMMER, T. Electric field properties of two commercial figure-8 coils in TMS: Calculation of focality and efficiency. **Clinical Neurophysiology**, 2004. v. 115, n. 7, p. 1697–1708.

TIAN, X. *et al.* Magnetic field direction differentially impacts the growth of different cell types. **Electromagnetic Biology and Medicine**, 2018. v. 37, n. 2, p. 114–125.

TURNER, D. A.; ADAMSON, D. C. Neuronal-Astrocyte Metabolic Interactions: Understanding the Transition into Abnormal Astrocytoma Metabolism. **J Neuropathol Exp Neurol.**, 2011. v. 70, n. 3, p. 167–176.

ULLIAN, E. M. *et al.* Control of Synapse Number by Glia. **Science**, 2012. v. 657, n. 2001.

VALIRON, O. *et al.* Cellular disorders induced by high magnetic fields. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, 2005. v. 22, n. 3, p. 334–340.

VERKHRATSKY, A.; NEDERGAARD, M. Physiology of astroglia. **Physiological Reviews**, 2018. v. 98, n. 1, p. 239–389.

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, 2006. v. 1, n. 3, p. 1112–1116.

VIRCHOW, R. **Die Cellularpathologie in Ihrer Begründung auf Physiologische and Pathologische Gewebelehre**. 1st. ed. Berlin: [s.n.], 1858.

VLACHOS, A. *et al.* Repetitive Magnetic Stimulation Induces Functional and Structural Plasticity of Excitatory Postsynapses in Mouse Organotypic Hippocampal Slice Cultures. **The Journal of Neuroscience**, 2012. v. 32, n. 48, p. 17514–17523.

VOLTERRA, A.; MELDOLESI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nature publishing group**, 2005. v. 6, p. 626–640.

WATANABE, Y.; NAKAGAWA, M.; MIYAKOSHI, Y. Enhancement of lipid peroxidation in the liver of mice exposed to magnetic fields. **Industrial Health**, 1997. v. 35, n. 2, p. 285–290.

WATERHOUSE, E. G.; XU, B. New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. **Molecular and Cellular Neuroscience**, 2009. v. 42, n. 2, p. 81–89.

YAKIR-BLUMKIN, M. BEN *et al.* Neuroprotective effect of weak static magnetic fields in primary neuronal cultures. **Neuroscience**, 2014. v. 278, p. 313–326.

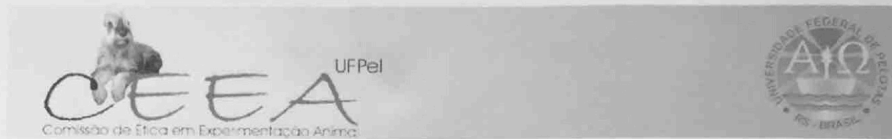
ZHANG, L. *et al.* Moderate and strong static magnetic fields directly affect EGFR kinase domain orientation to inhibit cancer cell proliferation. **Oncotarget**, 2016. v. 7, n. 27, p. 41527–41539.

_____ *et al.* Cell type- and density-dependent effect of 1 T static magnetic field on

cell proliferation. **Oncotarget**, 2017. v. 8, n. 8, p. 13126–13141.

ZHAO, G. *et al.* Cellular ATP content was decreased by a homogeneous 8.5 T static magnetic field exposure: Role of reactive oxygen species. **Bioelectromagnetics**, 2011. v. 32, n. 2, p. 94–101.

Anexos



Pelotas, 29 de agosto de 2016

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da estimulação elétrica e magnética em cultura de células neurais de ratos submetidos a um modelo de dor neuropática", registrada sob o nº 23110.004408/2016-84, sob a responsabilidade de Isabel Cristina Custódio de Souza que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer FAVORÁVEL a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 15/08/2016.

Finalidade	(X) Pesquisa	() Ensino
Vigência da autorização	01/09/2016 a 01/12/2018	
Espécie/linhagem/raça	Rattus norvegicus/Wistar	
Nº de animais	186	
Idade	30 dias	
Sexo	Machos	
Origem	Biotério Central – UFPel	

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 4408-2016).

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Ciente em: ____ / ____ /2016

Assinatura do Professor Responsável:

BRAZILIAN JOURNALS

INTERNATIONAL SCIENTIFIC JOURNALS



DECLARAÇÃO

A Revista Brazilian Journal of Development, ISSN 2525-8761, declara para os devidos fins, que o artigo intitulado “**Análise morfológica e bioquímica de astrócitos em cultura primária sob estimulação magnética estática.**” de autoria de *Caroline Crespo da Costa, Jéssica Marques Obelar Ramos, Eduarda Santa Helena, Nathalia Stark Pedra, Leo Anderson Meira Martins Martins, Paulo Roberto Stefani Sanches, Giovana Duzzo Gamaro, Izabel Cristina Custódio de Souza*, foi publicado no v. 6, n. 4, p, 20884-20895.

A revista é on-line, e os artigos podem ser encontrados ao acessar o link:
<http://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/issue/view/87>

Por ser a expressão da verdade, firmamos a presente declaração.

São José dos Pinhais, 24 de abril de 2020.

Prof. Dr. Edilson Antonio Catapan
Editor Chefe

Certification of knowledge of experience