

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA ESTÁTICA EM LINHAGEM CELULAR
DE NEUROBLASTOMA E NEUROBLASTOMA DIFERENCIADO

HELOUISE RICHARDT MEDEIROS

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA ESTÁTICA EM LINHAGEM CELULAR
DE NEUROBLASTOMA E NEUROBLASTOMA DIFERENCIADO

HELOUISE RICHARDT MEDEIROS

Orientador: Prof. Dr. Iraci L S Torres

Dissertação: apresentada como requisito parcial
para obtenção de Mestre em Medicina: Ciências
Médicas

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências
Médicas.

Porto Alegre

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Medeiros, Helouise
EFEITO DA ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA ESTÁTICA EM
LINHAGEM CELULAR DE NEUROBLASTOMA E NEUROBLASTOMA
DIFERENCIADO / Helouise Medeiros. -- 2017.

60 f.

Orientador: Iraci L S Torres.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2017.

1. Neuromodulação. 2. Estimulação Magnética
Estática. 3. SH-SY5Y. I. L S Torres, Iraci, orient.
II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

Agradecimentos

Durante esse dois anos só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me permitir acreditar na beleza da vida e os de sofrimento, serviram para um crescimento pessoal único. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

À minha orientadora **Prof^a Iraci Lucena da Silva Torres**, fonte inesgotável de conhecimento e profissionalismo, eu agradeço, primeiramente, por ter me aceitado, sem ao menos conhecer-me e por ter acreditado em mim. Pelas lições de neurologia e farmacologia e também pela confiança e conselhos, enfim, por sua existência e ainda por me deixar fazer parte dela. Amadureci como pesquisadora aprendendo muito contigo, admiro teu trabalho e tua pessoa.

À **Dr^a. Fernanda dos Santos de Oliveira** e **Dr^a. Elizabeth Obino Cirne Lima**, pelos ensinamentos, incentivo, amizade e dedicação. Vocês estiveram ao meu lado desde a graduação e não mediram esforços para me ajudar, sempre com uma solução simples para os meus problemas que pareciam ser gigantes. São exemplos únicos e que agradeço por estarem em minha vida. Admiro muito vocês duas!

Ao **Dr. Paulo Roberto Stefani Sanches**, pelas colaborações de materiais e de escrita e por estar conosco nessa parceria que deu tão certo.

A minha amiga de muitos anos, **Nicole Henckes**, obrigada pela indescritível solidariedade e afeto inestimável. Por acreditar que tudo daria certo no final, mesmo

quando a esperança era quase nula. E, principalmente, pelo ouvido que escutou tantas reclamações e pelas risadas que amenizavam o estresse diário, tornaste estes anos mais leves e divertidos, muito obrigado!

Ao **Laboratório de Embriologia e Dif. Celular**, muito obrigada pelas amizades, companheirismo e ajuda fatores muito importantes na realização desta dissertação e que me permitiram que cada dia fosse encarado com particular motivação. Estar neste laboratório é um presente da vida, pois são mulheres que sempre pude contar, desde os pequenos até os grandes problemas. Nada teria sido possível sem o ensinamento e ajuda de vocês!

Ao meu amor, **Matias Schimuneck**, meu ponto de equilíbrio, pela sua incansável boa vontade em me ajudar, compartilhando meus ideais e incentivando-me a prosseguir, insistindo para que eu avançasse cada vez mais um pouquinho. Enfim, por estar incessantemente ao meu lado, tanto nos repetitivos ensaios de apresentação como na parte estatística, nunca hesitou em me ajudar e me deu todo apoio possível, sendo muito mais do que se pode esperar. Amo você!

E por último, mas não menos importante, a minha família. Meus pais **Flávia Medeiros e Eduardo Medeiros**, e meu irmão, **Lucas Medeiros**, um enorme obrigado por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço e por todos os ensinamentos de vida. Espero que esta etapa, que agora termino, possa de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem. Só foi possível concluir este trabalho com todo o suporte que me deram durante o estudo. Obrigada família, dedico a vocês!

Gratidão é a memória do coração!

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações	16
2.2 Estimulação Magnética.....	19
2.3 Modelos celulares	21
3 MARCO CONCEITUAL.....	26
4. JUSTIFICATIVA	27
5. OBJETIVOS	28
5.1 Objetivo primário	28
5.2 Objetivos secundários.....	28
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
7. ARTIGO.....	35
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
9. PERPECTIVAS FUTURAS	65

RESUMO

Estimulação Magnética vem sendo utilizada no tratamento de várias patologias do sistema nervoso central, mas a compreensão de sua ação em nível celular precisa ser melhor investigada. Sendo assim, o objetivo principal desta dissertação foi estabelecer, em cultura celular, um método de Estimulação Magnética Estática (EME) e avaliar seu efeito em diferentes tipos celulares. Para tanto, foi desenvolvido um suporte de placa de cultura com ímãs NeFeB (neodímio-ferro-boro) com a forma cilíndrica de 12mm de diâmetro por 6mm de altura. Cada suporte apresenta seis ímãs espaçados, de modo que os campos magnéticos não interajam entre si. As células de neuroblastoma humano SH-SY5Y foram plaqueadas 1×10^6 células por poço e cultivadas em placas de 24 poços. A análise microscópica das placas demonstrou que as células adaptaram-se ao novo ambiente, demonstrando aderência e crescimento adequados à superfície da placa. Após este primeiro passo, as células SH-SY5Y foram estimuladas utilizando 0,1 T, 0,2 T e 0,3 T por 60 minutos, buscando determinar a melhor intensidade de EME. Após, este período de estimulação, para avaliar a viabilidade celular, foi realizado o ensaio de MTT (brometo de [3- (4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium) nos grupos de células estimuladas e não estimuladas. Não tendo sido observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados. A partir da obtenção destes dados, foram definidos os parâmetros de intensidade e período de estimulação da EME. Os experimentos foram, então, realizados aplicando 24 horas de estimulação com intensidade de 0,3T em culturas de diferentes tipos celulares. Optamos por utilizar, além de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, outro tipo de células tumoral, células de melanoma vaginal; e células de neuroblastoma diferenciado em células neuronais e células mesenquimais derivadas de adipócitos. Com estas escolhas objetivamos determinar a resposta de diferentes tipos celulares a EME. Para tanto, cada tipo celular foi dividido em 4 grupos, 2 grupos não estimulados (controles) avaliadas imediatamente (C1) e 24h após o final do experimento (C24), e 2 grupos estimulados por 24h, que foram avaliados imediatamente (E1) e 24h após o final da exposição a EME (E24). Para verificar a resposta celular a EME foram avaliados parâmetros de toxicidade (MTT, PI (Iodeto de propídeo) e HO (Hoechst), de neuroplasticidade (expressão do gene do receptor de BDNF (PCR em tempo real)) e ciclo celular (citometria de fluxo). Os resultados obtidos demonstram que imediatamente após a EME, houve uma diminuição significativa na viabilidade celular das células SH-SY5Y indiferenciadas (*Kruskal Wallis*, $P < 0,05$). Já no grupo 24h, não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos gru

pos avaliados (*Kruskal Wallis*, $P > 0,05$). Visto que, houve uma diminuição da viabilidade celular nas células SH-SY5Y, imediatamente após a estimulação, na busca de encontrar o mecanismo de ação pelo qual estas células apresentavam uma diminuição celular, utilizamos as técnicas de PI e de HO para avaliar apoptose e necrose celular, respectivamente. Adicionalmente avaliamos o ciclo celular. Desta forma e, considerando que apenas as células de neuroblastoma humano SH-SY5Y apresentaram diminuição significativa na viabilidade celular, somente neste tipo celular foi feito esta avaliação. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. No entanto, a análise descritiva demonstrou que, 24h após o estímulo, as células SH-SY5Y não diferenciadas apresentaram uma redução de duplicação celular (*Kruskal Wallis*, $P > 0,05$). Outro fator avaliado nas células SH-SY5Y diferenciadas e não diferenciadas, como parâmetro de neuroplasticidade, foi expressão do gene do receptor *Trk-β*. Não foi encontrada diferença significativa, no entanto na análise descritiva, as células SH-SY5Y não diferenciadas avaliadas 24h após a aplicação de EME, apresentaram um aumento na expressão deste gene, sugerindo um aumento da neuroplasticidade. Estes resultados demonstram um efeito de longa duração da EME, por pelo menos até 24h após o final da EME, corroborando com dados prévios de nosso grupo de pesquisa, utilizando modelos animais e ETCC (estimulação transcraniana por corrente contínua), outra técnica neuromodulatória, que mostraram efeito por até 7 dias após o término do tratamento. Interessantemente, não foram observadas diferenças na viabilidade celular nas demais culturas celulares analisadas. Estes resultados são muito relevantes, pois demonstram que, em relação aos parâmetros de viabilidade celular analisados, a EME é uma técnica segura no protocolo utilizado (24h de 0,3T de EME). Os dados desta dissertação demonstram que a EME apresenta diferentes efeitos em relação à toxicidade em células de tumores neuronais, tumores não neuronais e células com morfologia normal. A diminuição da viabilidade celular nas células SH-SY5Y indiferenciadas é um resultado surpreendente e favorável considerando ser linhagem celular tumoral. Desta forma estes resultados avaliados em conjunto sugerem que a EME é uma técnica segura que, em células normais não provocou alterações importantes nos parâmetros avaliados e em tumores de células não neuronais não alterou o crescimento celular. No entanto, ainda se faz necessário aumentar o número amostral da avaliação das fases do ciclo celular a expressão do gene *Trk-β*, assim como mais estudos para avaliar outros parâmetros de toxicidade e também diferentes protocolos de estimulação celular utilizando a EME.

ABSTRACT

Magnetic stimulation has been used in the treatment of various pathologies of the central nervous system, but the understanding of its action at the cellular level needs to be investigated. Thus, the main objective of this dissertation was to establish, in cell culture, a method of Static Magnetic Stimulation (SMS). For this purpose, a culture plate holder with NeFeB (neodymium-iron-boron) magnets with a cylindrical shape of 12mm in diameter by 6mm in height was developed. Cells were plated 1×10^6 cells per well and cultured in 24-well plates. Microscopic analysis of plaques demonstrated that the cells adapted to the new environment, demonstrating adequate adhesion and growth to the plaque surface. This was extremely important to the development of this article. After this first step, human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) were stimulated using 0.1 T, 0.2 T and 0.3 T for 60 minutes, in order to determine the best intensity of static magnetic stimulation. After this stimulation period, to evaluate cell viability, the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium] assay was performed on stimulated (stimulated group) and non-stimulated (control group) cells. No significant difference was observed between the groups evaluated. From the data obtained, it was defined the use of the highest intensity tested, an increase in the period of stimulation and application in other cell types. The experiments were then performed applying 24 hours of stimulation with 0.3T intensity in cultures of different cell types. Considering that the cells initially used were of neuronal tumor, we chose to use, in addition to human neuroblastoma cells, another type of tumor cells (vaginal melanoma cells), and cells with normal characteristics in their morphology, such as SH-SY5Y differentiated into neuronal cells and mesenchymal adipocyte-derived cells. With these choices we aimed to determine if different cell types would respond in the same way to SMS. In order to do so, each cell type was divided into 4 groups, 2 non-stimulated groups (controls) evaluated immediately (C1) and 24h at the end of the experiment (C24), 2 groups stimulated for 24h, which were evaluated immediately (S1) and 24h after the end of exposure to SMS (S24). To assess the cellular response to EME, toxicity parameters [MTT, PI (Propidium iodide) and HO (Hoechst)] and cell cycle (flow cytometry) were done. The results obtained demonstrate that immediately after SMS, a significant decrease in cell viability of undifferentiated SH-SY5Y cells was found (Kruskal Wallis, $P < 0.05$). In the 24h group, there was no statistically significant difference in any of the groups evaluated (Kruskal Wallis, $P > 0.05$). Since there was a decrease in cell viability in SH-SY5Y cells, immediately after stimulation, in the search to find the mechanism of action by which these cells had a cellular decrease, we used the PI and HO techniques to evaluate apoptosis and death cell and respectively. Additionally, we evaluated the cell cycle. In this way, and considering that only SH-SY5Y human neuroblastoma cells showed a significant decrease in cell viability, only this cell type was evaluated. There were no statistically significant differences between groups.

However, the descriptive analysis demonstrated that, 24 h after the stimulus, undifferentiated SH-SY5Y cells present a decrease in cytoplasm division in the G1 phase and, in G2 phase, a decrease in nuclear division, leading to a reduction of cell duplication (Kruskal Wallis, $P > 0.05$). Another factor evaluated in differentiated and undifferentiated SH-SY5Y cells as a parameter of neuroplasticity was expression of the Trk- β gene. No significant difference was found, however in the descriptive analysis, the undifferentiated SH-SY5Y cells evaluated 24h after the application of SMS showed an increase in the expression of this gene, suggesting an increase in neuroplasticity. These results demonstrate a long-term effect of SMS for at least 24 hours after the end of the SMS, supporting previous data from our research group, using animal models and TDCs (transcranial direct current stimulation), and another neuromodulatory technique, which showed effect for up to 7 days after the end of treatment. Interestingly, no differences in cell viability were observed in the other cell cultures analyzed. These results are very relevant because they demonstrate that, in relation to the cell viability parameters analyzed; SMS is a safe technique in the protocol used (24h of 0.3T of SMS). The data from this dissertation demonstrate that SMS has different effects in relation to toxicity in cells of neuronal tumors, non-neuronal tumors and cells with normal morphology. Decreased cell viability in undifferentiated SH-SY5Y cells is a surprising and favorable finding considering that it is a tumor cell line. Thus, these results evaluated together suggest that SMS is a safe technique that in normal cells did not induce important changes in the evaluated parameters and in non-neuronal cell tumors did not alter the cell growth. However, it is still necessary to increase the sample number of the evaluation of the phases of the cell cycle and the expression of the Trk- β gene, as well as more studies to evaluate other parameters of toxicity and also different protocols of cellular stimulation using SMS.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Estratégia de busca de referências bibliográficas de bases que fundamentaram os objetivos deste estudo. Caixas preenchidas indicam quantos artigos foram incluídos na dissertação. Este é o resultado da busca da combinação das palavras-chave17
- Figura 2** - Marco conceitual que exemplifica este estudo26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D - Três Dimensões

AR - Ácido Retinóico

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CTM - Células Tronco Mesenquimais

ECNI - Estimulação Cerebral Não-Invasivas

EME - Estimulação Magnética Estática

EMT - Estimulação Magnética Transcraniana

EMTe - Estimulação Magnética Transcraniana estática

EMTr - Estimulação Magnética Transcraniana repetitiva

ETCC - Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua

GAPDH - *Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase*

HMV-II - Células de Melanoma Vaginal

LMR - Limiar Motor de Repouso

PEM - Potencial Evocado Motor

SNC - sistema nervoso central

Trk- β - *Tropomyosin receptor kinase B*

1. INTRODUÇÃO

Estudos eletrofisiológicos têm aumentado muito o entendimento da atividade cerebral normal e em condições de doença. Os avanços tecnológicos podem ser observados em pesquisas de ponta em diversas áreas como neurologia, psiquiatria, psicologia e no incremento de terapias farmacológicas e não farmacológicas. Um dos grandes achados, a partir de estudos utilizando eletrofisiologia, tem sido a utilização de estimulação cerebral (NOOHI; AMIRSALARI, 2016).

As técnicas de estimulação cerebral não invasiva têm demonstrado resultados muito favoráveis, por serem métodos não invasivos, oferecendo mínimo ou nenhum risco ao paciente. Desta forma, tem sido possível a obtenção de resultados significativos de correntes de estimulação focal em áreas do córtex cerebral. Adicionalmente, vários métodos vêm sendo desenvolvidos, entre eles a Estimulação Magnética Transcraniana (EMT) (NOOHI; AMIRSALARI, 2016).

A técnica de EMT baseia-se na geração de um campo magnético por meio de uma bobina acoplada a um gerador. Este campo magnético aplicado no escalpo produz uma corrente elétrica capaz de despolarizar a membrana neuronal (BARKER; JALINOUS; FREESTON, 1985; ROSSI *et al.*, 2009). O estímulo magnético atinge aproximadamente 2cm de profundidade, podendo variar de acordo com a bobina utilizada (ZANGEN *et al.*, 2005). No entanto, este estímulo, além de atingir regiões corticais, pode atingir também, de forma indireta, regiões subcorticais (LEFAUCHEUR, 2006).

Estudos demonstram que estimulação de alta frequência (igual ou superior a 5Hz) promovem um aumento na excitabilidade do córtex motor (CHEN *et al.*, 1997;

MUELLBACHER *et al.*, 2000), indexado pelo aumento da amplitude do potencial evocado motor (MEP), observado após EMT Repetitiva (EMTr) (PASCUAL-LEONE *et al.*, 1994). Enquanto que estimulação de baixas frequências (em torno de 1Hz) diminuem a excitabilidade em córtex motor (CHEN *et al.*, 1997).

O foco maior de pesquisas tem sido o uso da EMT no tratamento da depressão, com efeito utilizando baixa frequência no córtex pré-frontal dorso lateral esquerdo (GEORGE, 1998). A aplicação também tem demonstrado bons resultados em pacientes pós acidente vascular encefálico, doença de Parkinson, epilepsia e dor neuropática (FREGNI; PASCUAL-LEONE, 2007).

Há muitos estudos demonstrando o efeito da EMTr, porém ela ainda pode provocar algum desconforto. Sendo assim, alguns cientistas estão utilizando a Estimulação Magnética Transcraniana estática (EMTe), por ser mais confortável (OLIVIERO *et al.*, 2011) e segura para pacientes saudáveis (OLIVIERO *et al.*, 2015). EMTe sobre o córtex motor inibe transitoriamente os potenciais evocados motor (PEMs), mas não modula o limiar motor de repouso (LMR) (ROSEN, 2003), indicando que o EMTe pode não afetar a excitabilidade da membrana dos neurônios piramidais, mas induzir mudanças em nível sináptico.

Outro interessante estudo avaliou o efeito do campo magnético estático entre proliferação celular e morte celular em células renais de ratos, demonstrando que as células tratadas com EMTe apresentam diminuição na proliferação e aumento de morte, comparadas as células não tratadas. Este tratamento, em astrócitos corticais, induziu efeitos inversos. As células tratadas apresentaram maior proliferação e menos morte, sugerindo que células diferentes respondem de diferentes formas ao estímulo do campo magnético estático (BUEMI *et al.*, 2001).

Apesar de evidências pré-clínicas (modelos animais e raras *in vitro*) e clínicas que utilizam técnicas de neuromodulação, o efeito dessas técnicas em células neuronais precisa ser melhor investigado.

Considerando que neurônios e glia são os principais tipos celulares constituintes do sistema nervoso, células de neuroblastoma (Linhagem SH-SY5Y) têm sido amplamente utilizadas em ensaios *in vitro* para estudos do efeito do campo magnético (MARCHESI *et al.*, 2014; TRILLO *et al.*, 2013). No entanto, como estas células são obtidas de uma linhagem celular isolada de um neuroblastoma, apresentam características neoplásicas, como alta taxa proliferativa e estágio de diferenciação precoce, caracterizado pela baixa presença de marcadores neuronais.

Dessa forma, as células SH-SY5Y proliferativas não representam um modelo experimental adequado para o estudo de mecanismos celulares e moleculares relacionados a neuropatologias. Recentemente, foi desenvolvido um protocolo de diferenciação celular objetivando estabelecer condições ideais para a diferenciação de células SH-SY5Y proliferativas em células com perfil neuronal dopaminérgico com características morfológicas e bioquímicas de neurônios dopaminérgicos (LOPES *et al.*, 2010). Com esta nova ferramenta, está sendo possível desenvolver novos trabalhos, com uma metodologia mais adequada para o estudo de doenças relacionadas ao sistema nervoso central, visto que este modelo utiliza células de origem humana com características neuronais, diminuindo as limitações inerentes ao uso de células tumorais (MIYAKOSHI, 2005).

Sendo assim, o objetivo principal desta dissertação foi estabelecer, em cultura celular, um método de Estimulação Magnética Estática (EME) e avaliar o que está estimulação pode gerar a diferentes tipos celulares.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta dissertação tem como objetivo avaliar os efeitos da estimulação magnética estática em células de neuroblastoma (SH-SY5Y), neuroblastoma diferenciado, células de melanoma vaginal (HMV II) e células mesenquimais derivadas de adipócitos. Avaliamos viabilidade, morte e ciclo celular, além de verificarmos a expressão do gene *Trk-β* nestas células após estimulação. A busca envolveu as seguintes bases de dados: LILACS, PubMed e Embase, no período de 2015 a 2017. Foram realizadas buscas através dos termos “*Transcranial Magnetic Stimulation*”, “SH-SY5Y”, “*Differentiated SH-SY5Y*”, “*Mesenchymal cells*”, “*HMV II*”, “*Trk-β*”, “*Cell cycle*”. Está pesquisa representada na Figura 1.

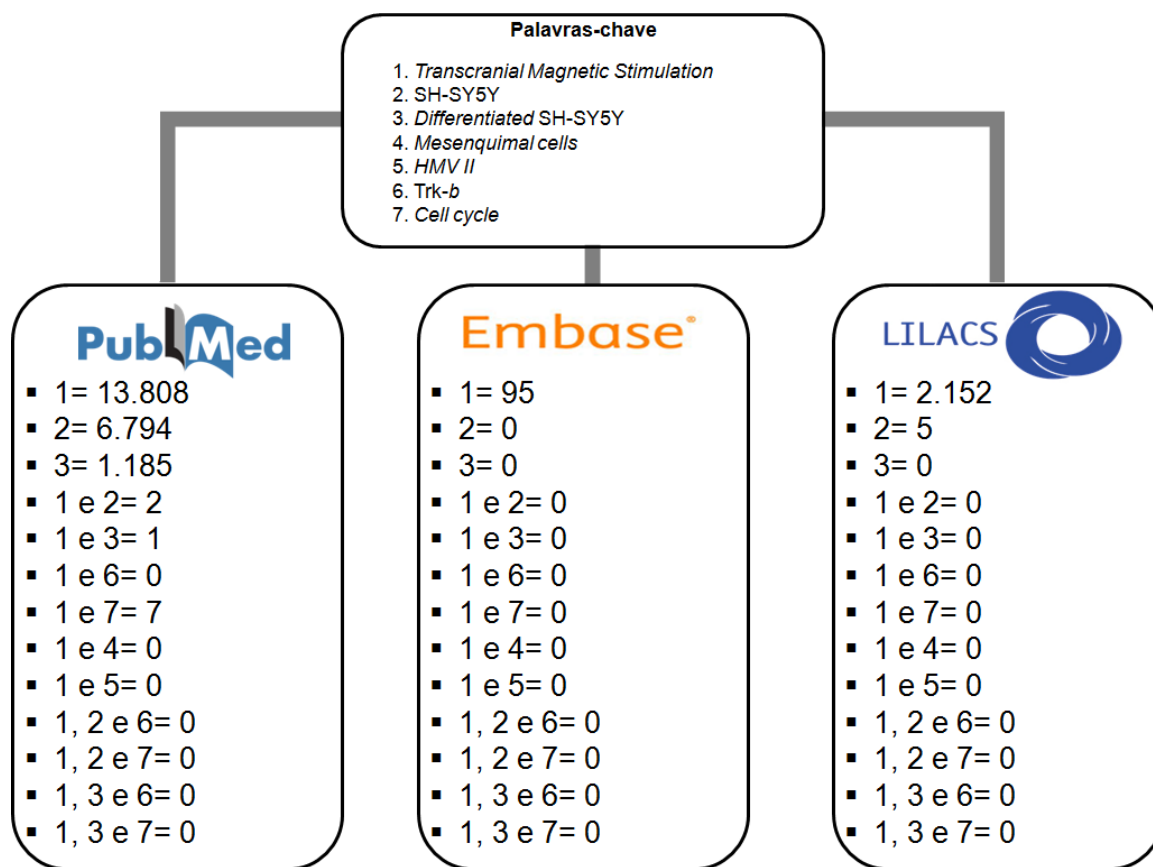


Figura 1- Estratégia de busca de referências bibliográficas de bases que fundamentaram os objetivos deste estudo. Caixas preenchidas indicam quantos artigos foram incluídos na dissertação. Este é o resultado da busca da combinação das palavras-chave.

2.2 Estimulação Magnética

O desenvolvimento de técnicas de estimulação cerebral não-invasivas (ECNI) conduziram a uma revolução conceitual e tecnológica nas pesquisas pré-clínicas e clínicas em neurociências. Algumas técnicas destinam-se a aplicação em áreas cerebrais específicas, modificando padrões de atividade neuronal envolvidos em processos cognitivos e comportamentais. Assim, a ECNI oferece uma relação causal entre regiões anatômicas e tais comportamentos e/ou impulsionar melhorias funcionais em pacientes saudáveis ou com danos cerebrais. Até agora, a fonte mais utilizada como ECNI tem sido a eletromagnética (VALERO-CABRÉ *et al.*, 2017). Em 1980, Merton & Morton, estabeleceram a técnica não invasiva de estimulação cerebral com eletrodos no escalpo e a utilizaram com êxito para estimular áreas motoras do cérebro através do escalpo, surgindo a Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) (MERTON; MORTON, 1980). Um rápido estímulo elétrico de alta voltagem no córtex primário motor (M1) produziu uma breve resposta sobre o potencial evocado motor. Este resultado sugeriu aos pesquisadores que esta poderia ser uma ferramenta terapêutica interessante em diversas situações clínicas, porém ainda muito dolorosa e desconfortável ao paciente.

Cinco anos após, Barker *et al.* (BARKER; JALINOUS; FREESTON, 1985), a partir da resolução de vários problemas técnicos, demonstraram que era possível alterar a excitabilidade cerebral com Estimulação Magnética Transcraniana (EMT), com pouca ou nenhuma dor. A nova técnica de EMT foi estimada para ser “sem dor, sem necessidade de contato direto com o escalpo, não invasiva e de fácil aplicação” (BARKER; JALINOUS; FREESTON, 1985). As respostas encontradas com a utiliza-

ção do EMT foram reportadas como: “Quando a bobina é colocada no escalpo, sobre a região apropriada do córtex motor, movimentos da mão ou perna opostos são facilmente obtidas sem causar angustia ou dor” (BARKER; JALINOUS; FREESTON, 1985).

Desde então, a EMT vem sendo utilizada como uma ferramenta efetiva para o entendimento da neurofisiologia, assim como para diagnóstico e monitoramento de doenças neurodegenerativas como Doença do Neurônio Motor e Esclerose Múltipla (CARAMIA *et al.*, 2004). Em decorrência disto, o interesse do EMT foi aumentando na pesquisa clínica, demonstrando potencial terapêutico para o tratamento de enxaquecas (LIPTON *et al.*, 2010), acidente vascular cerebral (NAM *et al.*, 2017), doenças psiquiátricas (GUO; LI; WANG, 2017), doenças neurodegenerativas como doença de Parkinson's (revisado KASHEZHEV; SINKIN; SKRIPKINA, 2017) e doença de Alzheimer (ZHAO *et al.*, 2016).

EMT é baseada em princípios de indução magnética descobertos por Faraday na primeira metade do século XIX (WAGNER; VALERO-CABRE; PASCUAL-LEONE, 2007), uma corrente elétrica de alta intensidade circula por um loop de fio condutor dentro de uma caixa protegida, sendo aplicada em qualquer área do escalpo. O uso terapêutico baseia-se na aplicação de um pulso magnético intenso na região a ser tratada através do crânio, rápida e intensa variação do campo magnético gera uma força eletromotriz induzida naquela região, provocando o aparecimento de correntes elétricas neste meio condutor. Aplicada em áreas corticais, a corrente induzida despolariza neurônios próximos à bobina e gera efeitos neurofisiológicos (PASCUAL-LEONE; WALSH, 2001; WAGNER; VALERO-CABRE; PASCUAL-LEONE, 2007).

EMT induz a neuroplasticidade por meio da modulação da eficácia sináptica, a partir de diferentes estímulos, podendo ser uma opção terapêutica. Se o estímulo vem da mesma via sináptica, é denominado homossináptica, se vem de diferentes vias, é chamada heterossináptica. O aumento da eficácia sináptica é conhecido como potenciação de longa duração (PLD) e sua diminuição, depressão a longa duração (DLD) (HALLETT, 2007).

A influência de campos Magnéticos Estáticos em sistemas biológicos tem sido de considerável interesse. De modo diferente da EMT repetitiva, os campos magnéticos estáticos não são associados com a indução de corrente elétrica, exceto quando há movimento dentro do campo. Seus efeitos biológicos são classificados conforme a intensidade do campo magnético: fraco (< 1mT), moderado (1mT a 1T), forte (1T a 5T) e super-forte (>5T). Campos geomagnéticos fracos são usados por vários organismos para orientação espacial e navegação (ROSEN, 2003). Campos fortes e ultra fortes têm intensidade suficiente para alterar a orientação preferencial de uma variedade de moléculas orgânicas. Exemplos de ação biológica desses campos incluem a alteração dos planos de clivagem em ovos de *Xenopus* após exposição a 16,7T (DENEGRÉ *et al.*, 1998) e mudanças no eletroencefalograma de macacos durante a exposição do sistema nervoso central a campos de 2-9T (BEISCHER; KNEPTON, 1966).

Os efeitos da Estimulação Magnética Estática (EME) na faixa moderada foram examinados em vários biosistemas, e os resultados sobre o sistema nervoso foram mais consistentes. Foram descritas alterações no eletroencefalograma em coelhos com campos de apenas 20mT (KHOLODOV; KHOLODOV, 1974). Foram relatadas alterações no potencial evocado somatossensorial em ratos durante a ex-

posição a campos de 50-400mT (CHANGES IN BRAIN-EVOKED POTENTIALS UNDER THE INFLUENCE OF A PERMANENT MAGNETIC FIELD | SPRINGER-LINK, [s.d.]) e mudanças no comportamento em ratos expostos a uma campo de 600mT (NAKAGAWA; MATSUDA, 1988).

EME é uma técnica confortável e segura para o paciente (OLIVIERO, Antonio *et al.*, 2011) e sujeitos saudáveis (OLIVIERO *et al.*, 2015). A estimulação é produzida colocando um pequeno ímã de terras raras (neodímio-ferro-boro ou samário-cobalto) sobre o córtex motor humano, capaz de modular a excitabilidade M1 (OLIVIERO *et al.*, 2011). EME sobre o córtex motor inibe transitoriamente os potenciais evocados motor (PEM), (ROSEN, 2003), indicando que EME pode afetar a excitabilidade da membrana dos neurônios piramidais, induzindo mudanças no nível sináptico.

Além disso, uma redução no LMR foi causada por inibição intracortical de latência curta (NOJIMA *et al.*, 2015), demonstrando que a modulação induzida por EME foi mediada por alterações plasmáticas nos circuitos inibitórios intracorticais que estão associados aos receptores ácido gama aminobutírico (ZIEMANN, 2004).

2.3 Modelos celulares

Os modelos experimentais *in vivo* são muito empregados para verificar a fisiopatologia e progressão de doença. Os animais mais comumente utilizados são ratos e camundongos, porém torna-se limitado extrapolar estes modelos para avaliação de mecanismos moleculares e celulares. Além disso, há uma variabilidade muito grande intraespécies e muitos fatores podem influenciar a pesquisa. Desta

forma são utilizados modelos *in vitro*, como cultivo celular, que pode ser dividido em três áreas: culturas primárias, organotípicas e de linhagens (SCHÜLE; PERA; LANGS- TON, 2009).

Cultura primária é advinda diretamente animais, onde o macerado celular é realizado no momento da morte. Para obtenção de culturas primárias são utilizados animais prenhes para a obtenção de embriões, o mesencéfalo do feto é retirado e, após o isolamento, as células são mantidas em meio específico (HAN *et al.*, 2003). A utilização de culturas de células primárias apresenta algumas vantagens em relação a avaliações morfológicas e bioquímicas, porém demonstram algumas limitações. O principal contraponto é a dificuldade de manipulação das células, pois além do processo de isolamento ser trabalhoso, a diferenciação culmina na formação de neurônios maduros, e as células não crescem na mesma velocidade. Além disto, culturas primárias dificilmente são homogêneas, dificultando a reprodutibilidade dos dados (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013).

Cultura organotípica envolve o crescimento celular em três dimensões (3D), ao contrário do que é usualmente utilizado. Esta cultura 3D é bioquímica e fisiologicamente similar ao tecido *in vivo*, porém é uma técnica desafiadora e complexa para a realização de ensaios de viabilidade celular (FALKENBURGER; SCHULZ, 2006).

Linhagem celular é uma alternativa muito utilizada em estudos *in vitro* por serem células imortalizadas, que podem ser mantidas por um longo tempo em cultura por terem uma alta taxa de proliferação, mas principalmente, por ser uma cultura homogênea, tendo uma alta reprodutibilidade (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013). Neste contexto, o tipo celular neuronal mais utilizado é a linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

Originalmente derivada de sítio metastático de medula óssea, células SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) são subclones derivados das SK-N-SH (ATCC® HTB-11™). SK-N-SH são células subclonadas três vezes, primeiramente em SH-SY, então em SH-SY5 e, finalmente, em SH-SY5Y. Desde 1970 são armazenadas na ATCC® de propriedade de June L. Biedler (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013). Estas células são caracterizadas morfológicamente por corpos celulares não polarizados de tipo neuroblástico com poucos processos truncados. Elas tentem a crescer em grupos e podem formar aglomerados onde as células crescem umas sobre as outras. As culturas apresentam células aderentes e células flutuantes. Alguns estudos demonstram que as células flutuantes são mais suscetíveis a diferenciação. As células SH-SY5Y são células que expressam marcadores tumorais imaturos que se proliferam continuamente. O que é uma desvantagem, visto que neurônios apresentam uma baixa taxa de proliferação (PÅHLMAN *et al.*, 1984). Apesar da origem tumoral, existem técnicas que possibilitam a diferenciação das células SH-SY5Y em neurônios dopaminérgicos.

A possibilidade de diferenciar as células de neuroblastoma SH-SY5Y em células com um fenótipo mais maduro e semelhante a um neurônio, manipulando o meio de cultura, proporcionou inúmeros benefícios no campo da neurociência. Com inúmeras vantagens em relação a cultura primária: a) capacidade de expansão em grande escala, com relativa facilidade e baixo custo (ROSS; SPENGLER; BIEDLER, 1983); b) por ser uma linhagem celular, não há as preocupações éticas; c) células SH-SY5Y são derivadas de seres humanos, expressando uma série de proteínas específicas que não estariam presentes em culturas primárias de roedores (ENCINAS *et al.*, 2000). Além disto, a diferenciação neuronal envolve uma série de even-

tos específicos, incluindo formação e extensão de processos neuríticos, aumento da excitabilidade elétrica da membrana plasmática, formação de sinapses funcionais, neurotransmissores e receptores específicos de neurônios (ADEM *et al.*, 1987).

Um dos métodos mais utilizados e melhor caracterizados para a indução de diferenciação em células SH-SY5Y é a adição de Ácido Retinóico (AR) ao meio de cultura. AR é um derivado de vitamina A, conhecido por possuir grande capacidade de inibir o crescimento e a diferenciação celular. De fato, a deficiência de vitamina A está ligada ao desenvolvimento de metaplasia escamosa em vários tecidos epiteliais, enquanto a administração de vitamina A, pode reverter esses efeitos e restaurar a diferenciação celular normal. Tipicamente, o AR é administrado a uma concentração de 10 μ M durante um mínimo de 3-5 dias, em meio de cultura com uma baixa quantidade ou sem soro, para induzir diferenciação celular (CHEUNG *et al.*, 2009). A diferenciação celular acontece pelo aumento da formação de catecolaminas, aumento da expressão da enzima enolase e pela expressão de fatores de crescimento. Estes eventos geram projeções citoplasmáticas (neuritos), promovendo modificações na morfologia celular de epitelial para estrelada. O processo de diferenciação provoca um aumento de marcadores dopaminérgicos, como tirosina hidroxilase e transportador de dopamina (EDSJÖ; HOLMQUIST; PÅHLMAN, 2007).

Além da busca de um maior conhecimento sobre o efeito da Estimulação Magnética Estática (EME) sobre a linhagem celular SH-SY5Y e sua diferenciação, diferentes tipos celulares são necessários para termos um melhor entendimento do funcionamento da EME, então utilizamos, também, células mesenquimais e de mucosa vaginal.

As células tronco mesenquimais (CTM) vêm sendo empregadas em diversas

situações por serem células indiferenciadas, adultas, multipotentes e com capacidade de autorrenovação. Estas células são caracterizadas pela aderência ao plástico quando em cultura, morfologia fibroblástica e capacidade de diferenciar-se em adipócitos, condrócitos e osteócitos (GEBLER; ZABEL; SELIGER, 2012; SHI *et al.*, 2012). As CTM estão presentes em praticamente todos os tecidos (medula óssea, tecido adiposo, tecido cardíaco, placenta, cordão umbilical, tecido nervoso), onde permanecem até serem recrutadas para a recuperação de tecidos que sofreram alguma injúria, migrando para o local da lesão (CAPLAN, 2009; SHI *et al.*, 2012).

A linhagem celular de mucosa vaginal foi estabelecida a partir de um melanoma maligno vaginal de uma mulher de 65 anos com tipo sanguíneo B. Sua morfologia é epitelial e não se tem um cariótipo definido (Cat. No. EC92042701). No entanto, há poucos estudos envolvendo esta linhagem celular.

3 MARCO CONCEITUAL

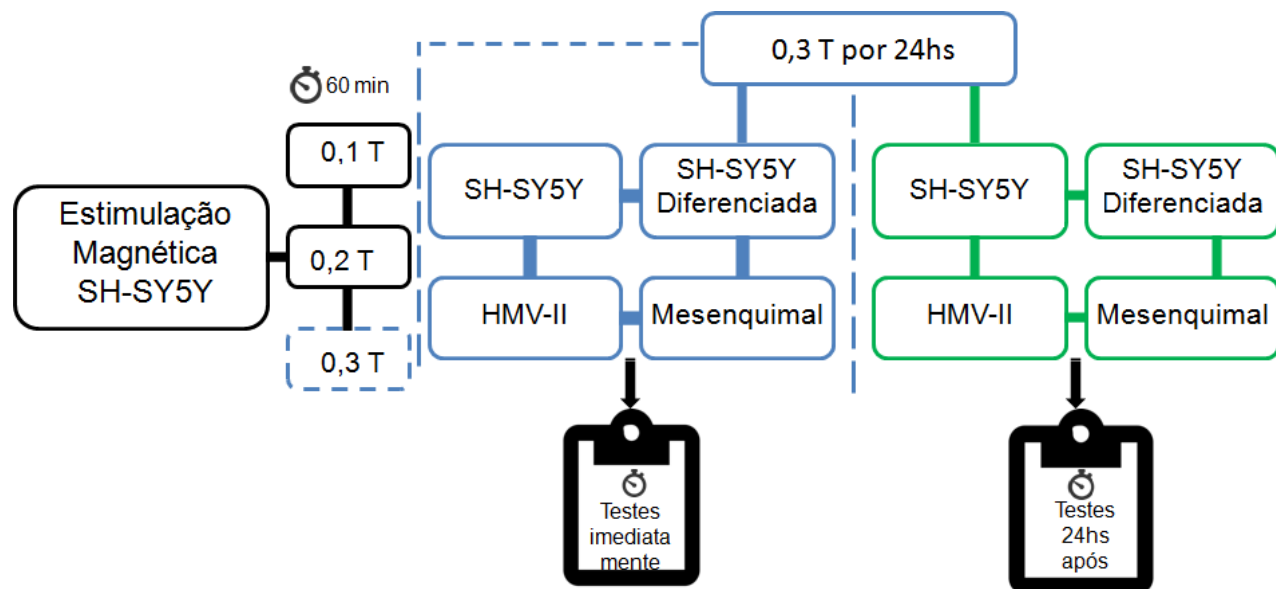


Figura 2 - Marco conceitual que exemplifica este estudo

4. JUSTIFICATIVA

Estimulação magnética é um procedimento não invasivo, que tem sido investigado e proposto como alternativa terapêutica em diversos processos crônicos, como fibromialgia, epilepsia e depressão. Estudos prévios têm demonstrado que técnicas de neuromodulação promovem melhora na resposta nociceptiva, tanto em ensaios pré-clínicos quanto clínicos. Porém poucos estudos abordam os efeitos inter e intracelulares da estimulação magnética estática (EME). Desta forma, esta dissertação de mestrado buscou estabelecer um método de EME em cultura de células e seu efeito em diferentes tipos celulares. Para tanto, avaliamos o efeito de diferentes protocolos de exposição de estimulação magnética em campo estático em culturas celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y, de SH-SY5Y diferenciadas, de Melanoma Vaginal (HMV-II) e de mesenquimais derivadas de adipócitos. Além de avaliarmos a toxicidade da técnica, se ela contribui para o aumento da neuroplasticidade e se interrompe alguma fase do ciclo celular. A escassez de estudos relacionados à cultura celular frente às técnicas de EME reveste esta dissertação de fundamental importância para a compreensão do funcionamento intrínseco destas técnicas, para que ela seja utilizada com segurança tanto em pesquisa clínica como para o tratamento de doenças.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo primário

Esta dissertação de mestrado buscou estabelecer um método de estimulação magnética estática em cultura de células e seu efeito em diferentes tipos celulares. Para tanto, avaliamos o efeito de diferentes protocolos de exposição de estimulação magnética em campo estático em culturas celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y, de SH-SY5Y diferenciadas, de Melanoma Vaginal (HMV II) e de mesenquimais derivadas de adipócitos, utilizando parâmetros de toxicidade, de neuroplasticidade e divisão celular.

5.2 Objetivos secundários

- Desenvolver um modelo de placas magnéticas compatíveis com placas de cultura celular para exposição das células ao campo magnético estático;
- Promover diferenciação de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y em células neuronais;
- Avaliar os efeitos da estimulação magnética estática em culturas de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, de melanoma vaginal, de neuroblastoma diferenciado em células neuronais e de mesenquimais derivadas de adipócitos.;
- Avaliar viabilidade celular nos diferentes tipos celulares utilizados (ensaio de MTT);
- Avaliar apoptose e necrose nos diferentes tipos celulares utilizados (colora-

ção de Iodeto de Potássio e Hoescht33342, respectivamente)

- Avaliar o ciclo celular em culturas de células de neuroblastoma humano SH-

SY5Y (Citometria de Fluxo);

- Avaliar expressão do gene Trk- β em culturas de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y e de neuroblastoma diferenciado em células neuronais (PCR em Tempo Real).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEM, A. et al. Muscarinic receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cell line: regulation by phorbol ester and retinoic acid-induced differentiation. *Brain Research*, [s. l.], v. 430, n. 2, p. 235–242, 1987.

BARKER, A. T.; JALINOUS, R.; FREESTON, I. L. NON-INVASIVE MAGNETIC STIMULATION OF HUMAN MOTOR CORTEX. *The Lancet*, [s. l.], v. 325, n. 8437, p. 1106–1107, 1985.

BEISCHER, D. E.; KNEPTON, J. C. The electroencephalogram of the squirrel monkey /*Saimiri sciureus*/ in a very high magnetic field. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://archive.org/details/nasa_techdoc_19660029439>

BUEMI, Michele et al. Cell Proliferation/Cell Death Balance in Renal Cell Cultures after Exposure to a Static Magnetic Field. *Nephron*, [s. l.], v. 87, n. 3, p. 269–273, 2001.

CAPLAN, AI. Why are MSCs therapeutic? New data: New Insight. [s.l: s.n.]. v. 217

CARAMIA, M.Donatella et al. Brain excitability changes in the relapsing and remitting phases of multiple sclerosis: a study with transcranial magnetic stimulation. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, [s. l.], v. 115, n. 4, p. 956–965, 2004.

Changes in brain-evoked potentials under the influence of a permanent magnetic field | SpringerLink. [s.d.]. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00785533>>. Acesso em: 25 out. 2017.

CHEN, R. et al. Depression of motor cortex excitability by low-frequency transcranial magnetic stimulation. *Neurology*, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 1398–1403, 1997.

CHEUNG, Yuen-Ting et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *NeuroToxicology*, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 127–135, 2009.

DENEGRE, James M. et al. Cleavage planes in frog eggs are altered by strong magnetic fields. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [s. l.], v. 95, n. 25, p. 14729–14732, 1998.

EDSJÖ, Anders; HOLMQUIST, Linda; PÅHLMAN, Sven. Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation. *Seminars in Cancer Biology*, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 248–256, 2007.

ENCINAS, M. et al. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *Journal of Neurochemistry*, [s. l.], v. 75, n. 3, p. 991–1003, 2000.

F LKENBURGER, B. H.; SCHULZ, J. B. Limitations of cellular models in Parkinson's disease research. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, [s. l.], n. 70, p. 261–268, 2006.

FREGNI, Felipe; PASCUAL-LEONE, Alvaro. Technology Insight: noninvasive brain stimulation in neurology—perspectives on the therapeutic potential of rTMS and tDCS. *Nature Reviews Neurology*, [s. l.], v. 3, n. 7, p. 383–393, 2007.

GEBLER, Antje; ZABEL, Olivia; SELIGER, Barbara. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends in Molecular Medicine*, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 128–134, 2012.

GEORGE, Mark S. Why would you ever want to?: Toward understanding the antidepressant effect of prefrontal rTMS. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 307–313, 1998.

GUO, Qian; LI, Chunbo; WANG, Jijun. Updated Review on the Clinical Use of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation in Psychiatric Disorders. *Neuroscience Bulletin*, [s. l.], 2017.

HALLETT, Mark. Transcranial Magnetic Stimulation: A Primer. *Neuron*, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 187–199, 2007.

HAN, Baek-Soo et al. Caspase-dependent and -independent cell death pathways in primary cultures of mesencephalic dopaminergic neurons after neurotoxin treatment. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, [s. l.], v. 23, p. 5069–5078, 2003.

KASHEZHEV, A. G.; SINKIN, M. V.; SKRIPKINA, N. A. [The use of transcranial magnetic stimulation in treatment of affective disorders in Parkinson's disease]. *Zhurnal Nevrologii I Psikhiatrii Imeni S.S. Korsakova*, [s. l.], v. 117, n. 6. Vyp. 2, p. 66–69, 2017.

KHOLO O , U . U riĩ ndreevich); KHOLO O , U . U riĩ ndreevich). ~~How~~ of magnetic fields on biological objects. [s. l.], 1974. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300513923>>. Acesso em: 25 out. 2017.

KOVALEVICH, Jane; LANGFORD, Dianne. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, [s. l.], v. 1078, p. 9–21, 2013.

- LEFAUCHEUR, J. P. The use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in chronic neuropathic pain. *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology*, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 117–124, 2006.
- LIPTON, Richard B. et al. Single-pulse transcranial magnetic stimulation for acute treatment of migraine with aura: a randomised, double-blind, parallel-group, sham-controlled trial. *The Lancet. Neurology*, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 373–380, 2010.
- LOPES, Fernanda Martins et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Research*, [s. l.], v. 1337, p. 85–94, 2010.
- MARCHESI, Nicoletta et al. Autophagy Is Modulated in Human Neuroblastoma Cells Through Direct Exposition to Low Frequency Electromagnetic Fields. *Journal of Cellular Physiology*, [s. l.], v. 229, n. 11, p. 1776–1786, 2014.
- MERTON, P. A.; MORTON, H. B. Stimulation of the cerebral cortex in the intact human subject. *Nature*, [s. l.], v. 285, n. 5762, p. 227, 1980.
- MIYAKOSHI, Junji. Effects of static magnetic fields at the cellular level. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Effects of static magnetic fields relevant to human health. [s. l.], v. 87, n. 2–3, Effects of static magnetic fields relevant to human health, p. 213–223, 2005.
- MUELLBACHER, Wolf et al. Effects of low-frequency transcranial magnetic stimulation on motor excitability and basic motor behavior. *Clinical Neurophysiology*, [s. l.], v. 111, n. 6, p. 1002–1007, 2000.
- NAKAGAWA, M.; MATSUDA, Y. A strong static-magnetic field alters operant responding by rats. *Bioelectromagnetics*, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 25–37, 1988.
- NAM, Kyung Eun et al. Long-term effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on disability in patients with stroke. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, [s. l.], 2017.
- NOJIMA, Ippei et al. Static magnetic field can transiently alter the human intracortical inhibitory system. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, [s. l.], v. 126, n. 12, p. 2314–2319, 2015.
- NOOHI, Sima; AMIRSALARI, Susan. History, Studies and Specific Uses of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) in Treating Epilepsy. *Iranian Journal of Child Neurology*, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–8, 2016.
- OLIVIERO, A. et al. Safety Study of Transcranial Static Magnetic Field Stimulation (tSMS) of the Human Cortex. *Brain Stimulation: Basic, Translational, and Clinical Research in Neuromodulation*, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 481–485, 2015.

OLIVIERO, Antonio et al. Transcranial static magnetic field stimulation of the human motor cortex. *The Journal of Physiology*, [s. l.], v. 589, n. Pt 20, p. 4949–4958, 2011.

PÅHLMAN, S. et al. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differentiation*, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 135–144, 1984.

PASCUAL-LEONE, A. et al. Responses to rapid-rate transcranial magnetic stimulation of the human motor cortex. *Brain: A Journal of Neurology*, [s. l.], v. 117 (Pt 4), p. 847–858, 1994.

PASCUAL-LEONE, A.; WALSH, V. Fast backprojections from the motion to the primary visual area necessary for visual awareness. *Science (New York, N.Y.)*, [s. l.], v. 292, n. 5516, p. 510–512, 2001.

ROSEN, Arthur D. Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. *Cell Biochemistry and Biophysics*, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 163–173, 2003.

ROSS, R. A.; SPENGLER, B. A.; BIEDLER, J. L. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *Journal of the National Cancer Institute*, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 741–747, 1983.

ROSSI, Simone et al. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clinical Neurophysiology*, [s. l.], v. 120, n. 12, p. 2008–2039, 2009.

SCHÜLE, Birgitt; PERA, Renee A.Reijo; LANGSTON, J.William. Can cellular models revolutionize drug discovery in Parkinson's disease? *Biochimica Et Biophysica Acta*, [s. l.], v. 1792, n. 11, p. 1043–1051, 2009.

SHI, Yufang et al. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends in Immunology*, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 136–143, 2012.

TRILLO, MARÍA ÁNGELES et al. Retinoic acid inhibits the cytoproliferative response to weak 50-Hz magnetic fields in neuroblastoma cells. *Oncology Reports*, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 885–894, 2013.

VALERO-CABRÉ, Antoni et al. Transcranial Magnetic Stimulation in basic and clinical neuroscience: a comprehensive review of fundamental principles and novel insights. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, [s. l.], 2017.

WAGNER, Timothy; VALERO-CABRE, Antoni; PASCUAL-LEONE, Alvaro. Noninvasive human brain stimulation. *Annual Review of Biomedical Engineering*, [s. l.], v. 9, p. 527–565, 2007.

ZHAO, Junwu et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation improves cognitive function of Alzheimer's disease patients. *Oncotarget*, [s. l.], v. 8, n. 20, p. 33864–33871, 2016.

ZIEMANN, Ulf. TMS and drugs. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, [s. l.], v. 115, n. 8, p. 1717–1729, 2004.

7. ARTIGO

Static magnetic stimulation decreases viability of the SH-SY5Y cells

Medeiros, H.R.^{b,e}; Cirne-Lima E.O.^e. Oliveira F. S.O.^e. Stapenhorst, M.^e, Nunes. L.^e, Almeida, V.,
Henckes, N.A.A.C^e, Fregni, F^c., Caumo, W^a., Sanches, P.R.S^d.,
Torres I.L.S^{a,b}.

^aPost-Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^bLaboratory of Pain Pharmacology and Neuromodulation: Pre Clinical Studies - Pharmacology Department, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^cLaboratory of Neuromodulation, Department of Physical Medicine & Rehabilitation, Spaulding Rehabilitation Hospital & Massachusetts General Hospital. Harvard Medical School and Center for Non-invasive Brain Stimulation, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA.

^dResearch and Development Service in Biomedical Engineering - Research and Graduate Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

^eLaboratory of Embryology and Cell Differentiation - Research Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

*CORRESPONDING AUTHOR:

Iraci Lucena da Silva Torres – iltorres@hcpa.edu.br

Department of Pharmacology - ICBS, UFRGS.

Street Sarmiento Leite, 500, 305.

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: 0055-51 3308 3183; FAX: 0055-51 3308 3121.

Abstract: Magnetic Stimulation has been used in the treatment of various pathologies of the nervous system, but the understanding of the exact mechanism of action of this technique on the cellular response needs to be better investigated. Thus, the main objective of this article was to establish, in cell culture, a method of Static Magnetic Stimulation (SMS). For this, a culture plate holder with NeFeB (neodymium-iron-boron) magnets was developed. The cells were plated 1×10^6 cells per well and cultured in 24-well plates. Microscopic analysis of plaques demonstrated that the cells adapted to the new environment. After this first step, human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) were stimulated using 0.1T, 0.2T and 0.3T for 60 min, in order to determine the best intensity of static magnetic stimulation. The experiments were performed applying 24 hours of SMS with 0.3T intensity in cultures of different cell types. We used SH-SY5Y cell, vaginal melanoma cells, SH-SY5Y differentiated into neuronal cells and mesenchymal adipocyte-derived cells. Each cell type was divided into 4 groups, 2 non-stimulated groups (control group) evaluated immediately (CI) and 24h at the end of the experiment (C24), 2 groups stimulated for 24h, and evaluated immediately (SI) and 24h after the end of exposure to SMS (S24). In order to verify the cellular response to SMS, toxicity parameters (MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium], PI ([Propidium iodide](#)) and HO (Hoechst)), neuroplasticity [BDNF receptor expression, Trk- β (Tropomyosin receptor kinase B)] and cell cycle (flow cytometry) were done. The results demonstrate statistically significant decrease in the cell viability of undifferentiated SH-SY5Y cells immediately after SMS (Kruskal Wallis, $P < 0.05$). In the 24h group, there was no statistically significant difference in relation to control (Kruskal Wallis, $P > 0.05$). In addition, no greater cell death or cell cycle arrest was found in SH-SY5Y (Kruskal Wallis, $P > 0.05$). In the other cells type there was no decrease in cell viability or a greater cell death. Another factor evaluated in differentiated and undifferentiated SH-SY5Y cells as a parameter of neuroplasticity was expression of the Trk- β gene. No significant difference was found, however in the descriptive analysis, the undifferentiated SH-SY5Y cells evaluated 24h after the application of SMS showed

an increase in the expression of this gene, suggesting an increase in neuroplasticity. These results evaluated together suggest that SMS is a safe technique that in cells with normal morphology did not induce important changes in the evaluated parameters and in non-neuronal cell tumors did not alter the cell growth. Decreased cell viability in undifferentiated SH-SY5Y cells is a surprising, and favorable finding, considering that it is a tumor cell line. More investigations are needed to understand what causes the decrease in cell viability of SH-SY5Y cells.

Key-words: Neuroblastoma cells, Static Magnetic Stimulation, Cell Death.

1. INTRODUCTION

Over the years, electrophysiological studies have expanded the understanding of normal brain activity and its pathological conditions. Technological advances have shown an important part in the improvement of therapies or in the research of several areas such as neurology, psychology, and psychiatry (ZIEMANN, 2017). One of the greatest findings of the electrophysiology has been the brain stimulation. In this way, the non-invasive brain stimulation has shown favorable results, and it is possible to perform treatments with less risk to the patient. Thus, it is possible to reach significant results with focal stimulation of the areas of the cortex, without to induce important adverse effects (HALLETT, 2007). Several methods were developed, among them, the Transcranial Magnetic Stimulation (TMS).

The TMS technique is based in the magnetic field generation through a coil attached to a generator. This magnetic field goes through the skull, and it produces an electric current capable of depolarize the neurons membranes. The magnetic stimulation reaches to approximately 2cm depth. This parameter can vary accordingly to the coil used (BARKER; JALINOUS; FREESTON, 1985). The Static Magnetic Stimulation (SMS) is not associated to induction of electric current, except when there is movement within the field (ROSEN, 2003). There are few studies explaining their effects on the nervous cells. Previous study compared the effect of the static magnetic field in the cell proliferation, and cell death in the renal cells and cortical astrocytes in rats. This study showed that treated renal cells presented a proliferation decrease, and rise in the apoptosis and necrotic cell compared to non-treated cells. On the other hand, cortical astrocytes showed the inverse effect; the treated cells showed more proliferation and less death (BUEMI et al., 2001). These results suggest that different cells types are able to respond by different ways to the static magnetic field. In 1993, Rosen, reports on the advantages of using magnetic stimulation in breast cancer, increasing cell death in this type of cell (ROSEN, 1993).

In this way, it is necessary a better understanding about the effects and action mechanism

of SMS in cell cultures. Therefore, in this pre-clinical investigation, we aim evaluated the SMS effects on human neuroblastoma cells SH-SY5Y, differentiated cell SH-SY5Y, cell line HMVII and mesenquimal, analyzing viability, apoptosis, necrosis and cell cycle of these cells. After this, we will be a better understanding of the cellular morphology and physiology in response to the static magnetic stimulation.

3. METHODS

3.1. Cell culture and differentiation: Human neuroblastoma cell line SH-SY5Y, obtained from ATCC (American Type Culture Collection), were maintained in 1:1 Ham's F12 and Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM Low) (GIBCO, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (GIBCO, Brazil), and 1% penicillin/streptomycin (GIBCO, USA), in 5% of CO₂ in air at 37 °C. The cels were seeded in 24-well plated the density of 1×10^6 cells per well and all stimulations were performed when cells were 75% confluence. Differentiation was induced, 24h after plating with specific medium culture: FBS 1% plus retinoic acid (RA) at 10 μ l during 4, 7 and 10 days (LOPES et al., 2010). This treatment was replaced each three days to replenish RA the culture medium. To evaluate the differences in cell morphology in proliferative and cells differentiated for 4, 7 and 10 days, the cells were evaluated under phase contrast light microscopy.

3.2 Cell lineage HMVII and mesenchymal stem cells: HMVII cells were maintained in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 (GIBCO, USA) supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 1% penicillin/streptomycin (GIBCO, Brazil) in 5% of CO₂ in air at 37 °C. Mesenquimal stem cells were maintained in DMEM (GIBCO, Brazil) with 20% heat-inactivated FBS (GIBCO, Brazil) and 1% penicillin/streptomycin(GIBCO, Brazil) 5% of CO₂ in air at 37 °C. The time and intensity of stimulation was the same of the SH-SY5Y. Both cells types were seeded in a 24-well plated the density of 1×10^6 cells per well.

3.3. Static magnetic stimulation: Cell culture stimulation was done in a special designed plate attached a stand 24 wells plate with NeFeB (neodymium-iron-boron) magnets with the cylindrical shape of 12mm diameter by 6mm height. Each stand had six magnets spaced out so that the magnetic fields do not interact. It had an adjustment of the distance between the culture plate and the support to guarantee the magnetic field strength in the wells of the culture plate. The magnetic field traversed a layer or several layers of cells, in the same way, i.e., cell grouping or density no change the field. The adjustment of the magnetic field was performed with customized screw and to measure the magnetic field was used a Hall Effect Gaussmeter (Kashava 5), available at the HCPA Biomedical Engineering Laboratory (Figure 1). Initially, we chose three magnetic field intensities 0.1T, 0.2T and 0.3T ($\pm 2\%$ tolerance). After this, we choose 0.3T for 24 hours of static magnetic stimulation (SMS) cells exposure.

3.4. Application of magnets (Figure 2): Initially was made one session with magnetic stimulation for 60 minutes with 0,1T, 0,2T e 0,3T intensities. After this, the intensity of magnetic stimulation was 0,3T to be applied for 24 hours. Each cell type was divided into 4 groups, 2 non-stimulated groups (controls) evaluated immediately (CI) and 24h at the end of the experiment (C24), 2 groups stimulated for 24h, which were evaluated immediately (SI) and 24h after the end of exposure to EME (S24). All experiments were done immediately and 24h after magnetic stimulation.

3.5. MTT assay: The assay with 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma Aldrich, Brazil) is a colorimetric assay that reflects cell viability. Immediately and 24h after SMS exposure, cells were incubated with MTT in saline (132mM NaCl, 4mM KCl, 1mM CaCl₂, 6mM glucose, 10mM HEPES, pH 7.4). Without removing the medium from the cells, 0.75mg/ml MTT was added, incubated for 1 hr at 37°C and dimethyl sulfoxide (DMSO) added for cell disruption. The absorbance was determined at a wavelength of 570nm, using a wavelength of 620nm as a reference in an ELISA reader. Cell viability was expressed as a percentage

relative to the absorbance determined in the control cells.

3.6. Identification of cells death: Viable and dying cells were identified after staining of the nuclei with Propidium Iodide (PI) (Thermo Fischer, UK) and Hoechst 33342 (HO) (Sigma Aldrich, Brazil). The cells were incubated in a solution containing PI and HO 5mg/ml for 15 minutes and visualized in to fluorescence microscopy. To quantify the number of dead/alive cells, ten photos per well were taken, randomly chosen. The images were analyzed using ImageJ software.

3.7 Cell cycle: cells were treated, trypsinized, centrifuged, and washed with PBS (Laborclin, Brazil) twice. Then, cells were resuspended in 50 µg/ml PI (Sigma-Aldrich, Brazil) and 0.1% Triton X-100 PI (Sigma-Aldrich, Brazil) in a 0.1% sodium citrate solution (Sigma-Aldrich, Brazil), maintaining the ratio of 1×10^6 cells/ml PI solution. Cells were incubated on ice for 15 min prior to analysis using the flow cytometer Attune® Acousting Focusing Cytometer (Applied Biosystem-Life-Thermo).

3.8 Trk-β: the total RNA was extracted as recommended by the manufacturer RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA). Complementary DNA was synthesized from 1µg RNA using SuperScript VILO™ (Invitrogen, Brazil). PCR reactions were prepared using MasterMix TaqMan (Applied Biosystems, USA) and using StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Germantown, MD, USA). Real-time PCR was optimized to run under the initial incubation conditions of 95 ° C for 2 min, 95 ° C denaturation for 15 sec, annealing at 60 ° C for 1 min for 45 cycles. The expression level of the Trk-β gene was normalized with the Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) with $\Delta\Delta CT$ correlation.

3.9 Statistical analysis: Data are presented as median (interquartile 25; interquartile 75), the data were evaluated with Kruskal Wallis. Values of $P < 0.05$ were considered significant. All analyzes was performed using the statistical software SPSS (Statistical for Social Science-Version 22.0 Inc., Chicago, IL, USA).

4. RESULTS

4.1. Cell viability and cell death: after plating the SH-SY5Y cells in 24-well plates, three different intensities of 0.1T, 0.2T, 0.3T of SMS for 60 min, and the control without SMS exposure were tested. MTT was then performed to evaluate the cytotoxicity levels induced by SMS. The median (interquartile 25; interquartile 75) were: control:0.64nm(0.64nm;0.71nm); 105mT:0.71nm(0.65nm;0.71nm); 198mT:0.70nm(0.70nm;0.71nm); 305mT:0.64nm(0.58nm;0.66nm). Using this time and these intensities no statistical differences between the groups were found (Kruskal Wallis, $P>0.05$ Figure 3).

After this, a highest intensity of 0.3T, and a longer time (24 hours) have been chosen. After 24h of SMS exposure, the group evaluated 24h after SH-SY5Y cells did not show significant difference in the MTT assay in relation to control group (C24=0.63nm(0.54nm;0.72nm); S24=0.67nm(0.54nm;0.84nm); Kruskal Wallis $P>0.05$). However, when the stimulated SH-SY5Y cells were evaluated immediately after the SMS there was a significant decrease in the MTT levels (CI=0.71nm(0.65nm;0.75nm), SI=0.58nm(0.45nm;0.63nm); Kruskal Wallis $P<0.05$, figure 4, panel A) in relation to control group; thus, there is a cellular viability decrease. Despite, when the differentiated SH-SY5Y cells were used, there was no difference between groups (CI=0.14nm(0.14nm;0.16nm), SI=0.15nm(0.13nm;0.20nm); C24=0.17nm(0.15nm;0.17nm), S24=0.14nm(0.13nm;0.16nm); Kruskal Wallis $P>0.05$, Figure 4, Panel A). Also, when the adipose-derived mesenchymal cells and HMV II cells were evaluated, there were no differences between groups (CI=0.33nm(0.32nm;0.35nm), SI=0.36nm(0.43nm;0.39nm); Figure 4, Panel A; C24=0.52nm(0.32nm;0.36nm), S24=0.37nm(0.27nm;0.41nm); Figure 4, Panel B; Kruskal Wallis $P>0.05$) and (and (CI=1.11nm(1.07nm;1.30nm), SI=1.09nm(0.92nm;1.27nm); Figure 4, Panel A; C24=1.90nm(1.47nm;2.38nm), S24=1.85nm(1.54nm;2.18nm); Figure 4, Panel B; Kruskal Wallis $P>0.05$), respectively.

Considering the significant decrease in the MTT levels, observed in the SH-SY5Y cells submitted to 24h SMS exposure, and evaluated immediately after SMS stimulation, we

performed the staining of PI and HO to evaluate live cells, necrosis and apoptosis. We did not find an increase in cellular death in this group (CI=1.15%(0.54%;1.70%), SI=1.43%(0.35%;3.36%); Kruskal Wallis $P>0.05$, Figure 5, Panel A). The SH-SY5Y cells, from the 24h group, also did not demonstrate higher cellular death (C24 =1.28%(0.66%;2.05%), S24=0.91%(0.54%;3.03%); Kruskal Wallis $P>0.05$, Figure 5, Panel B). The other three cell types were analyzed, SH-SY5Y differentiated (CI=7.09%(3.11%;18.55%), SI=6.90%(4.42%;8.12%); Figure 4, Panel A; C24=26,05%(18.10%;30.54%), S24=23.98%(14.84%;39.97%); Kruskal Wallis $P>0.05$), mesenchymal (CI=8.40%(0.98%;18.55%), SI=10.15%(1.57%;12.08%); Figure 4, Panel A; C24=26.05%(18.10%;30.54%), S24=23.98%(14.84%;39.97%); Figure 5, Panel B; Kruskal Wallis $P>0.05$), and HMV II (CI=2.65%(1.32%;9.96%), SI=2.02%(1.07%;7.14%); Figure 5, Panel A; C24=23.59%(17.10%;42.97%), S24=22.03%(16.89%;50.96%); Figure 5, Panel B; Kruskal Wallis $P>0.05$). The four cell types were submitted the same protocol, but we did not find any significant differences.

4.2. Cell cycle: In non-differentiated SH-SY5Y cells, flow cytometry was performed to verify in which phase of the cycle these cells were found. In the SI, when we evaluated the sub-G1, G1, S, G2 and >4N phases there was no statistical differences in relation to its control group (CI: sub-G1=2.92%(1.0%;4.68%), G1=44.55%(37.03%;41;63%), S=13.56%(12.39%;21.02%), G2 =19.97%(12.93%;27.54%), >4N =9,01%(8.54%;14.97%), SI: sub-G1=3.57%(0.47%;3.95%), G1=44.36%(42.78%;62.11%), S=13.58%(11.88%,21.68%), G2=19.09%(13.49%;25.10%), >4N =9.92%(8.46%;12.72%); Kruskal Wallis $P>0.05$, Figure 6, Panel A). In 24h group, there are no difference in sub-G1, G1, S and G2, but in >4N there was an increase in relation to the control (C24: sub-G1=3.24%(0.72%;4.32%), G1=44.46%(40.09%;62.74%), S=13.57%(12.14%;21.35%), G2=19.53%(13.21%;26.32%), >4N=9.23%(8.73%;12.85%), S24: sub-G1=3.32%(1.33%;19.61%), G1=34.41%(14.06%;48.97%), S=19.80%(15.91%;39.78%), G2=14.14%(9.6%;15.02%), >4N =13.23%(13.13%;34.54%); Kruskal Wallis $P>0.05$, Kruskal

Wallis $P > 0.05$, Figure 6, Panel A).

4.3 Expression of Trk- β : these results were analyzed descriptively. In the undifferentiated SH-SY5Y cells evaluated immediately after the end of SMS, there was a small decrease in gene expression in relation to the SH-SY5Y not stimulated. However, when we evaluated the SH-SY5Y cells 24h after the end of SMS, there was a large increase in this expression ($C=1.48(0.49;2.31)$, $SI=0.48(0.17;0.94)$, $S_{24}=5.28(3.52;5.38)$, Kruskal Wallis, $P > 0.05$, Figure 7, Panel A). However, no statistically significant difference was found between groups. In differentiated SH-SY5Y cells, we found no statistically significant difference between the groups (Fig. 5) ($C=0.90(0.63;1.73)$, $SI=0.83(0.71;0.92)$, $S_{24}=0.47(0.44;0.49)$, Kruskal Wallis, $P > 0.05$, Figure 7, Panel B).

5. DISCUSSION AND CONCLUSION

This study demonstrates that SH-SY5Y cells exposed to 24 hours of SMS showed a decrease in cell viability immediately after the end of exposure. However, this was not a long-lasting effect because at 24h after exposure the cell returned to its initial state. On the other hand, other cell types evaluated did not present alteration in the viability cell. Previous study using glioblastoma cells submitted to SMS for 24h corroborate our result in cell viability (KIM et al., 2016). However, in the present study we observed that differentiated SH-SY5Y cells, mesenchymal cells and HMV II did not change in the cell viability. Previous study showed that SMS affects the membrane excitability of pyramidal neurons, inducing change in the synaptic level. In addition, the SMS effects using in moderate field were examined in many biosystems, and the results on CNS were more significant, because SMS acts by synaptic efficiency modulation (HALLETT, 2007). In this way, we can suggest that SMS selectivity acts in cells excitable, and that do not have normal morphology as the SH-SY5Y cells.

To better understand the cell viability decrease in SH-SY5Y cells, we performed the

staining of PI and HO to evaluate if there was an increase in cell death, but we did not find a difference in relation to their respective control group, immediately and 24h after 24h of SMS. Previous study using SH-SY5Y cells demonstrated a increase necrotic cell death when the cells were submitted to SMS and cisplatin compared to treatment using SMS alone. Cisplatin is a drug used by cancer patients, then the authors suggested that the SMS may need to be used with other medicines to present a more harmful response (VERGALLO et al., 2014).

Other cell types did not present higher cell death in relation to their controls, corroborating to the result found in relation to cell viability. Another study analyzed six human solid cancer cell lines including colon cancer, skin cancer, lung cancer, breast cancer, prostate cancer and bladder cancer cells, using SMS with 1T of intensity, and it found an increase in cell death (ZHANG et al., 2017). Thus we can suggest that in our study could be necessary to increase the intensity of the magnetic stimulus to find cell death.

As we did not find an increase in cell death in SH-SY5Y cells in the immediate group, we performed flow cytometry to analyze the cell cycle, once there could be some alteration in the cell cycle that would justify the decrease of cellular viability. No difference was observed between the groups (CI and SI) in the different phases of cell cycle. The descriptive analysis of undifferentiated SH-SY5Y cells, 24 h post-challenge, demonstrate: *(i)* sub-G1 phase increase over control; *(ii)* decreased cytoplasmic division in the G1 phase; *(iii)* increased chromatic doubling in the S phase; and *(iv)* decrease in nuclear division in G2 phase (Fig. 8). These factors led to a reduction of cell duplication, reducing the total number of new cells. The group analyzed immediately after the stimulation remains the same as the control at all stages of the cell cycle.

When we analyzed group 24h, there were no differences between the phases of the cycle, but in the >4N, which would be polyploid cells, has an increase in relation to the control no stimulated. These cells may be in senescence or entering in mitotic catastrophe. It would be interesting to do nuclear morphometry to analyze if this is truly happening.

Through Real-Time PCR, we evaluated the Trk- β gene, which is a BDNF receptor, a neurotrophin involved in the neuroplasticity process. This gene had its expression increased, although not statistically, in SH-SY5Y 24h cells after stimulation. These results of cell cycle and expression of Trk- β , even analyzed in a descriptive way, can show a long-term effect of SMS, corroborating previous data from our research group, using animal models and TDCs, another neuromodulatory technique, which demonstrated a long-lasting effect.

This study has as a limitation the short sample number. In the future, we aim to increase the sample number of the experiments to find more precise results in order to decrease variability. We can also test other methodologies such as using Western Blot to analyze cell death, since it would be a technique with less bias and more reproducibility.

In conclusion, the objective of this study of development of a suitable support for SMS, in that all cells receive the same magnetic intensity, practical and easy to handle, very different from those found in the literature, was reached. The adaptation analyzed to the new environment of cells showed that they grew very well, and continued to adhere to the surface of the plaque.

The results obtained in this study are very relevant because they demonstrate that, considering the parameters analyzed, SMS is a safe technique in the protocol used (24h of 0.3T SMS). The decreased cell viability in undifferentiated SH-SY5Y cells is a surprising and favorable finding considering that it is a tumor cell line. These results demonstrate that SMS has different effects in relation to toxicity in neuronal tumor cells, non-neuronal tumors and healthy cells. What suggests to us that SMS is a safe technique that, in normal cells did not induce important changes in the evaluated parameters, and in non-neuronal cells did not induce cell growth. Further investigations into this area will be necessary better to understand as the SMS acts in the culture cells.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors were supported by the Brazilian's agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Dra ILS Torres; Dr Wolnei Caumo, Dr Sanches P.R.S), Federal University of Rio Grande do Sul and Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education – CAPES (Helouise Medeiros). We also want to thank the Engineering Division from the HCPA for having developed the SMS stimulator; the Graduate Research Group of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre – GPPG (I.L.S. Torres, grant number 15-0567); MCT/FINEP – COENG/2013. PRONEM FAPERGS.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no competing interests regarding the publication of this paper. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- BARKER, A. T.; JALINOUS, R.; FREESTON, I. L. NON-INVASIVE MAGNETIC STIMULATION OF HUMAN MOTOR CORTEX. **The Lancet**, [s. l.], v. 325, n. 8437, p. 1106–1107, 1985.
- BUEMI, Michele et al. Cell Proliferation/Cell Death Balance in Renal Cell Cultures after Exposure to a Static Magnetic Field. **Nephron**, [s. l.], v. 87, n. 3, p. 269–273, 2001.
- HALLETT, Mark. Transcranial Magnetic Stimulation: A Primer. **Neuron**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 187–199, 2007.
- KIM, Seung Chan et al. Static magnetic field controls cell cycle in cultured human glioblastoma cells. **Cytotechnology**, [s. l.], v. 68, n. 6, p. 2745–2751, 2016.
- LOPES, Fernanda Martins et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. **Brain Research**, [s. l.], v. 1337, p. 85–94, 2010.
- ROSEN, A. D. A proposed mechanism for the action of strong static magnetic fields on biomembranes. **The International Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 73, n. 1–2, p. 115–119, 1993.
- ROSEN, Arthur D. Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. **Cell Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 163–173, 2003.
- VERGALLO, Cristian et al. Impact of inhomogeneous static magnetic field (31.7-232.0 mT) exposure on human neuroblastoma SH-SY5Y cells during cisplatin administration. **PloS One**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. e113530, 2014.
- ZHANG, Lei et al. Cell type- and density-dependent effect of 1 T static magnetic field on cell proliferation. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 13126–13141, 2017.
- ZIEMANN, Ulf. Thirty years of transcranial magnetic stimulation: where do we stand? **Experimental Brain Research**, [s. l.], v. 235, n. 4, p. 973–984, 2017.

LEGENDS

Fig 1. Magnetic support for static magnetic stimulation

Fig 2. Plate on SMS

Fig 3. Analysis of MTT of the SH-SY5Y, stimulated (305mT) for 60 min and controls. Mean values \pm SEM, $p \leq 0,05$.

Fig 4.

Panel A Analysis of the MTT levels in the SH-SY5Y, SH-SY5Y differentiated cells, HMV II and stimulated MSCh (305mT) in relation to its controls, immediately after SMS exposure. The data were expressed in the median (interquartile 25; interquartile 75). The same letters indicate no difference between groups and different letters indicate statistical difference (Kruskal Wallis, $P \leq 0,05$).

Panel B Analysis of the MTT levels in the SH-SY5Y, SH-SY5Y differentiated cells, HMV II and stimulated MSCh (305mT) in relation to its controls, 24 hours after SMS exposure. The data were expressed in median (interquartile 25; interquartile 75). The same letters indicate no difference between groups and different letters indicate statistical difference (Kruskal Wallis, $P \leq 0,05$).

Fig 5.

Panel A Analysis of the PI and HO in relation to its controls, immediately after SMS exposure in the SH-SY5Y, SH-SY5Y differentiated cells, HMV II and stimulated MSCh (305mT). The data were expressed in median (interquartile 25; interquartile 75), $p \leq 0,05$. The same letters indicate no difference between groups and different letters indicate statistical difference (Kruskal Wallis, $P \leq 0,05$).

Panel B Analysis of the PI and HO and their controls, 24 hours after SMS exposure SH-SY5Y, SH-SY5Y differentiated cells, HMV II and stimulated MSCh (305mT). The data were expressed in median (interquartile 25; interquartile 75), $p \leq 0,05$. The same letters indicate no difference between groups and different letters indicate statistical difference (Kruskal Wallis, $P \leq 0,05$).

Fig 6.

Panel A analysis of SH-SY5Y, stimulated (305mT) for 24h and after performing cytometry to evaluate cell cycle and control. The data were expressed in median (interquartile 25; interquartile 75), $p \leq 0,05$.

Panel B Analysis of SH-SY5Y, stimulated (305mT) for 24h and and after a further 24h without stimulation performing cytometry to evaluate cell cycle and control. The data were expressed in median (interquartile 25; interquartile 75), $p \leq 0,05$.

Fig 7.

Panel A Analysis of the gene expression of the SH-SY5Y cell Trk- β gene in the stimulated group for 24h and soon after RNA extraction and in the group stimulated for 24h and 24h later, without stimulation, RNA extraction was performed.

Panel B Analysis of the gene expression of the Trk- β gene of the differentiated SH-SY5Y cells in the group stimulated for 24h and soon after RNA extraction and in the group stimulated for 24h and 24h later, without stimulation, RNA extraction was performed.

Fig 8. Analysis of the cell cycle in undifferentiated SH-SY5Y cells, in the group stimulated for 24h and soon after cytometry and in the group stimulated for 24h and 24h later, without stimulation, performed cytometry.

Figure 1

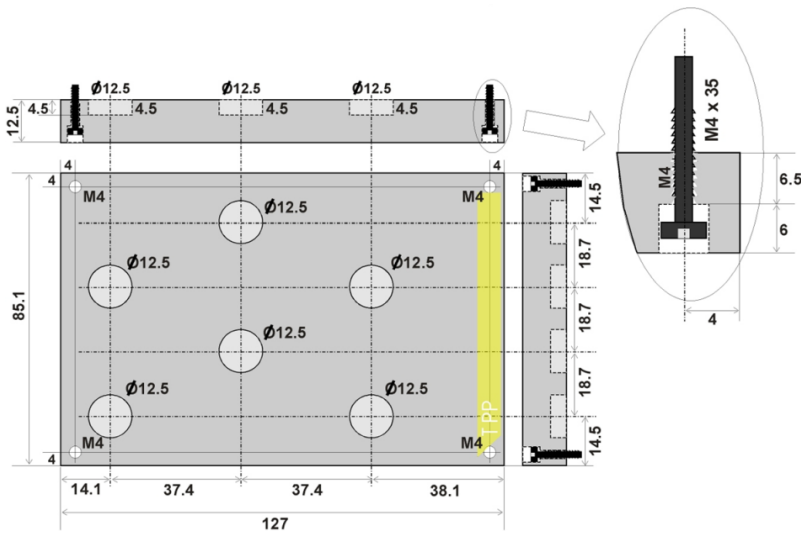


Figure 2

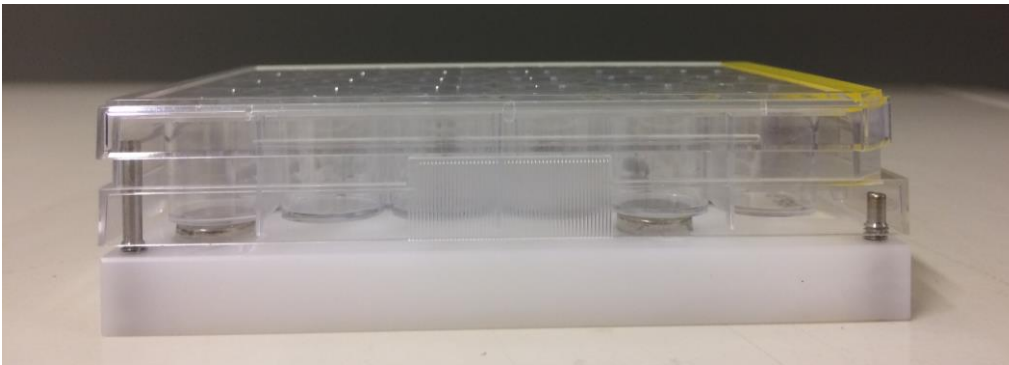


Figure 3

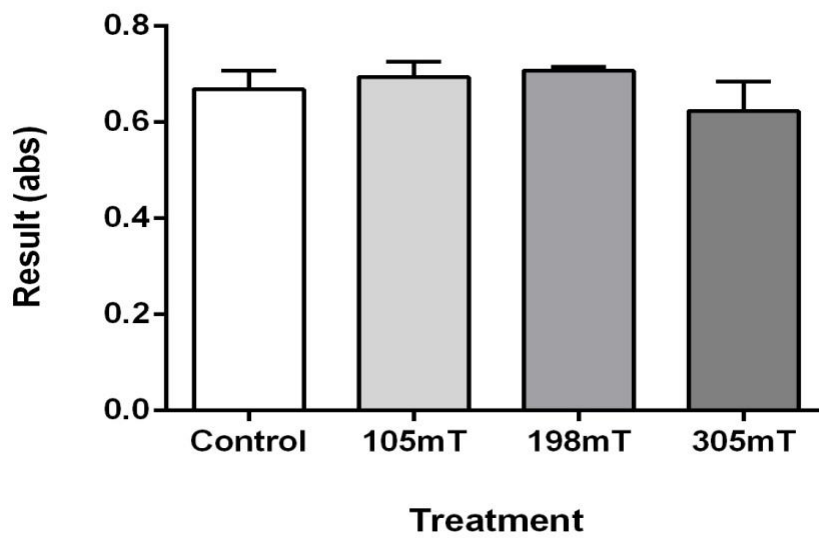
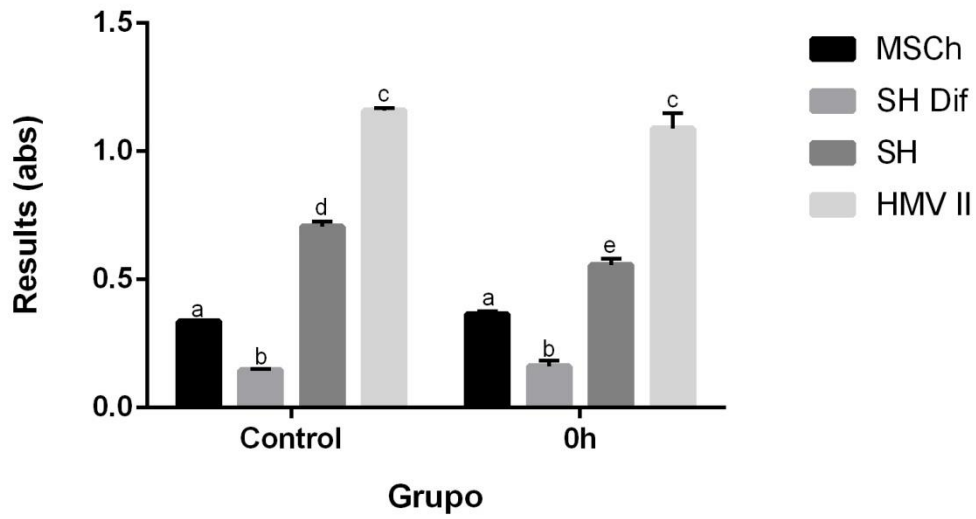


Figure 4

Panel A



Panel B

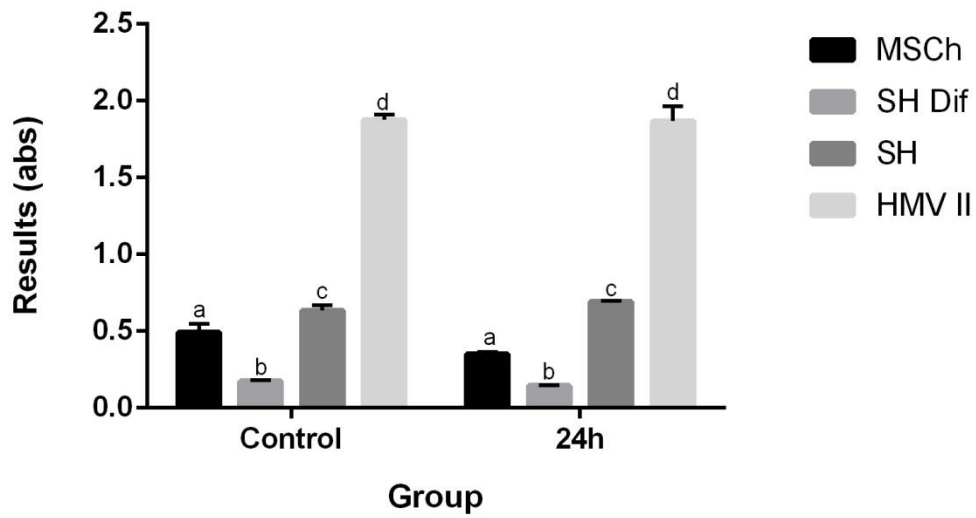
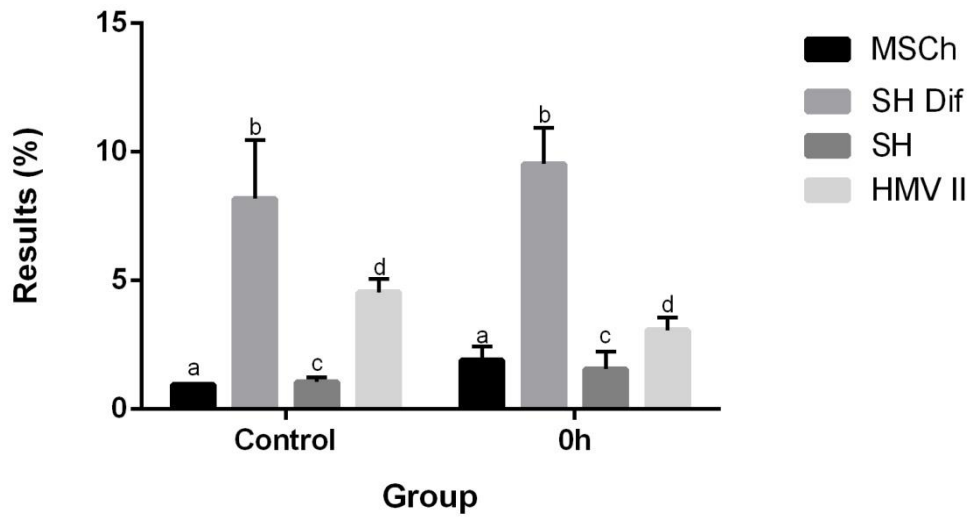


Figure 5

Panel A



Panel B

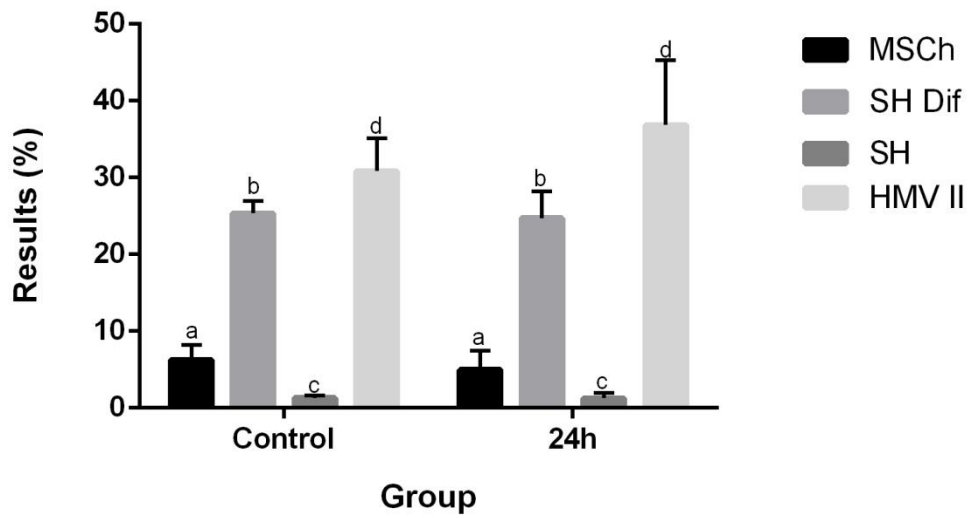
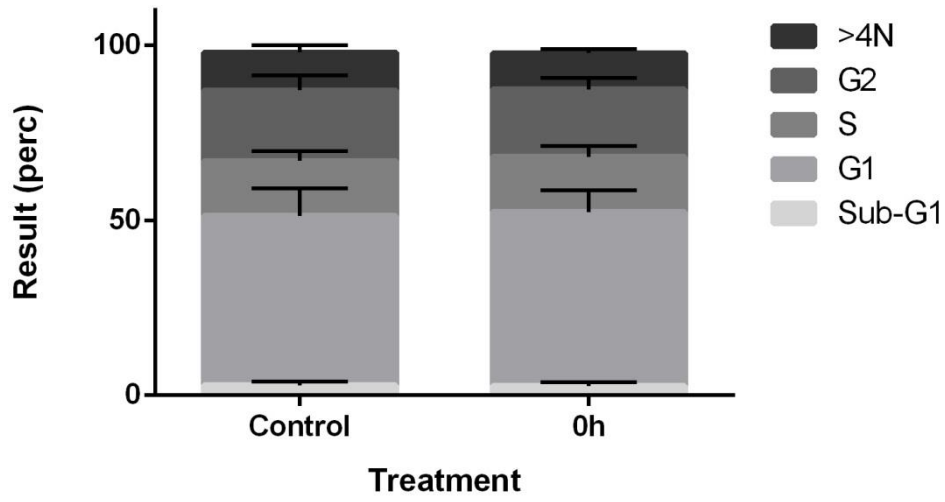


Figure 6

Panel A



Panel B

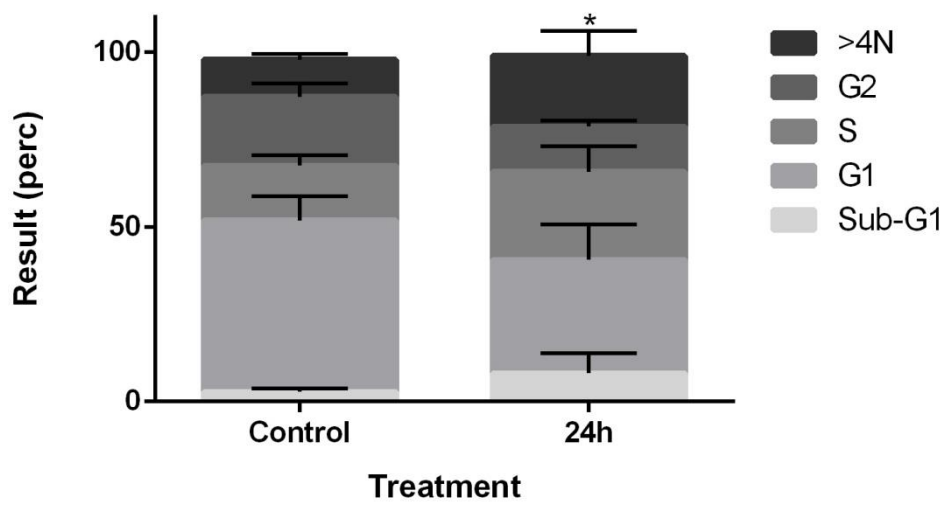
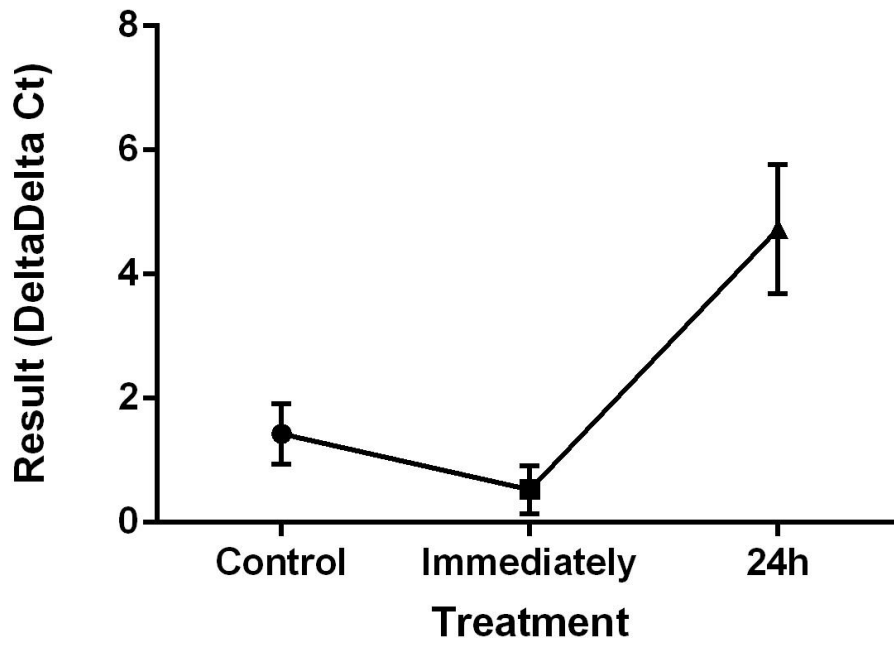


Fig 7.

Panel A



Panel B

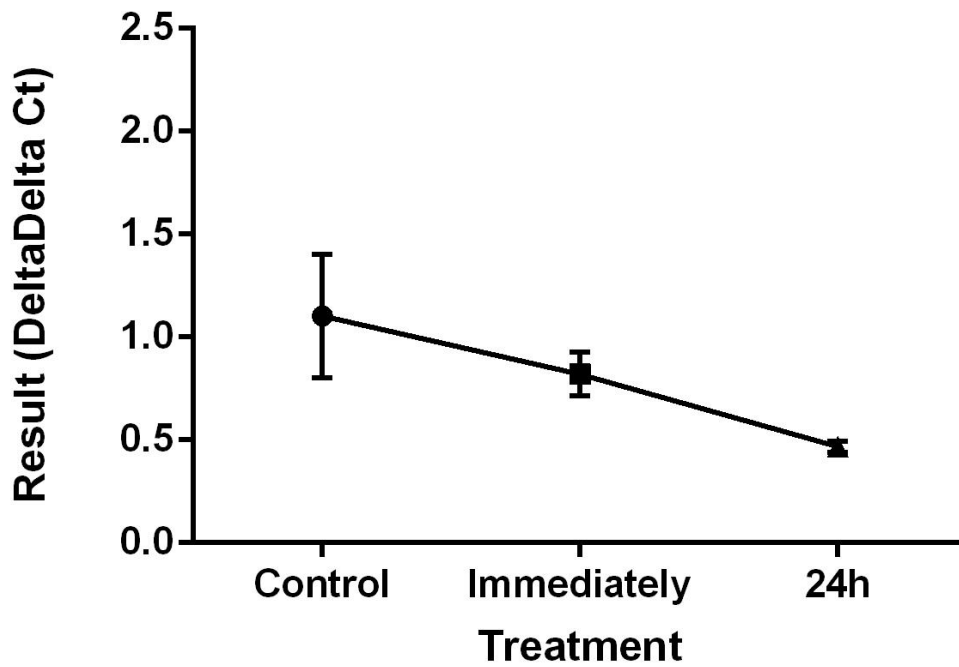
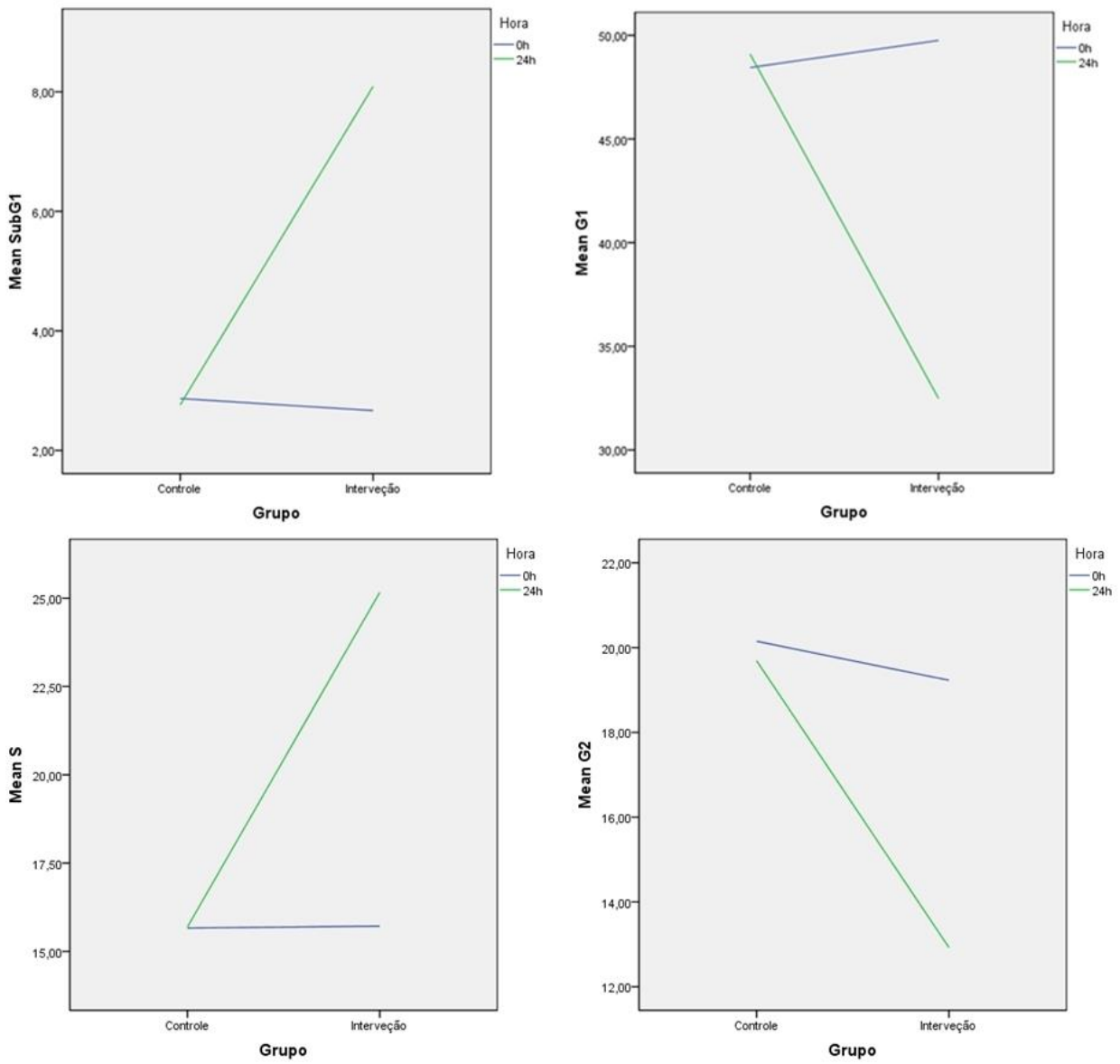


Fig 8



8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de um suporte adequado para EME, atingiu o objetivo de que todas as células recebam a mesma intensidade magnética. O suporte desenvolvido é prático e de fácil manuseio, muito diferente dos descritos na literatura. A avaliação microscópica demonstrou que as células se adaptaram ao novo ambiente, aderindo e crescendo de forma adequada na superfície da placa

A diferenciação das células SH-SY5Y deve ser destacada, pois foi executada com êxito. Sendo muito importante o cuidado da troca de meio e principalmente a adição do Ácido Retinóico em quantidade adequada.

O fato da EME alterar a viabilidade celular das células SH-SY5Y imediatamente após a exposição a 24h de EME, deve ser mais bem investigado, visto que não foi encontrada morte ou alteração no ciclo celular. O achado, na análise descritiva, da menor duplicação celular nas células SH-SY5Y 24 horas após a EME, indica a necessidade de aumento do número amostral, buscando diminuir a variabilidade e obter diferença estatisticamente significativa.

Por fim, este estudo contribuiu para o desenvolvimento de um modelo de Estimulação Magnética Estática *in vitro*, o que subsidiará a realização de outros estudos buscando um melhor entendimento dos efeitos e mecanismos de ação da EME em cultura celular.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Após o desenvolvimento do suporte magnético estático definindo o tempo e intensidade proposto, iremos aumentar o número amostral, diversificar nossas práticas para avaliar ciclinas, e ver sua interferência no ciclo celular, canais de cálcio, interleucinas e outros testes para entendermos ainda mais sobre essa técnica. Acreditamos importante estabelecer uma curva de tempo e intensidade de estimulação.

Em futuros estudos buscaremos estabelecer novos protocolos com intensidades variáveis e menor tempo de estimulação. Desta forma buscaremos avaliar se seus efeitos são duradouros e dependentes do tempo e ainda. Outro objetivo será a avaliação da resposta a SMS de outros tipos celulares, como células da glia e cultura primária de outros tipos celulares do SNC, assim como, em experimentos *in vivo*, utilizando animais.

A escassez de estudos relacionados à cultura celular frente às técnicas de EME demonstra a necessidade de estimular novos estudos que avaliem o funcionamento intrínseco destas técnicas, para que sejam utilizadas com segurança tanto em pesquisa clínica como no tratamento de doenças.