

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITO E LINHAGEM DE GLIOMA SUBMETIDAS A ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA ESTÁTICA

JÉSSICA OBELAR¹; CAROLINE CRESPO DA COSTA²; GIOVANA DUZZO GAMARO³; IZABEL CRISTINA CUSTÓDIO DE SOUZA⁴

¹ Universidade Federal de Pelotas – jessicaobelar@gmail.com

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

³ Universidade Federal de Pelotas – giovanagamaro@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – belcustodio20@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Pacientes acometidos por câncer podem apresentar quadros de dor. A causa das dores é multifatorial e pode variar de acordo, com o tipo de câncer, e sua localização no organismo (PAICE & FERREL, 2011; SIEGEL, MILLER & JEMAL, 2015). O quadro de dor oncológica é normalmente tratado com terapias medicamentosas, baseadas no uso de fármacos opióides. No entanto, a utilização prolongada desses fármacos pode levar a dependência do indivíduo. Muitos estudos são desenvolvidos no intuito de encontrar novas drogas que possam substituir esse grupo de medicamentos, porém sem sucesso (CHWISTEK, 2017).

Pesquisas têm focado na busca de terapias ou adjuvantes não-farmacológicos, entre estes, a estimulação magnética transcraniana (EMT) pode ser um bom tratamento para a dor oncológica (NIZARD, et al., 2015). A Estimulação Magnética (EM) é capaz de produzir um campo magnético com efeitos diretos nas células, mas ainda pouco relatados na literatura (CHWISTEK, 2017).

Estudos realizados em modelos animais mostram a capacidade da EMT em alterar níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). O BDNF é responsável pela sensibilização das vias de dor e em tais testes mostrou relação com a diminuição da percepção de dor (NIJS, et al., 2015). A EMT pode estimular a produção de BDNF que atua sobre o mecanismo das vias de dor, podendo ser utilizadas como tratamento adjuvante (CHERNY, et al., 2011; KNOTKOVA, 2015).

Os quadros de dor pela compressão que o glioma faz sobre áreas do cérebro são relatados antes mesmo da década de 50 (HORRAX, 1946). Nas terapias que usam EMT, muitas células poderão responder ao estímulo, não apenas as tumorais, tendo em vista que o campo magnético poderá alcançar até mesmo as células saudáveis, como as da glia, por exemplo.

Cabe ressaltar que os efeitos da estimulação magnética (EM) em cultura primária de astrócitos ainda não foi relatada na literatura. O dispositivo utilizado para tal foi confeccionado para que o grupo realizasse os testes *in vitro*.

Levando em conta as considerações acima, o presente trabalho teve como objetivo comparar a morfologia de astrócitos, obtidos em cultura primária, e linhagem C6 de glioma estimuladas magneticamente com 300mT por 5, 15 e 30 minutos durante sete dias. Os resultados obtidos a partir da análise por microscopia óptica estão descritos a seguir.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados 5 ratos Wistar neonatos para obtenção dos astrócitos para o cultivo primário. Os animais foram eutanasiados e o córtex foi coletado, dissecado, colocado em solução salina e homogeneizado para obtenção das células. Após, os astrócitos foram semeadas em placas de 24 poços, bem como, a linhagem de glioma.

As células obtidas a partir da cultura primária foram mantidas por 20 dias nas condições ideais de temperatura ($\sim 37^{\circ}\text{C}$) e de CO_2 (5%) até atingirem a confluência. Após iniciou-se estimulações. As células da linhagem de glioma, começaram a ser estimuladas após 24h de cultivo, embora a confluência ainda não tivesse sido atingida.

Para as estimulações magnéticas em cultura celular foi utilizado um dispositivo (Figura 2) criado pela Bioengenharia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). As placas com células colocadas sobre o dispositivo recebem 300mT de estimulação magnética estática (EME). A cultura primária de astrócitos e a linhagem C6 de glioma receberam a estimulação magnética de 300mT por 5, 15 e 30 minutos durante sete dias. A padronização da cultura de células sobre o dispositivo de EME está apresentado na figura 1.



Figura 1– Foto do dispositivo criado pela Bioengenharia do HCPA, utilizado para as estimulações magnéticas das placas com células em cultivo.

Para fins de comparação foram obtidas placas controles para ambos os modelos de cultivo celular (cultura primária e linhagem). Durante os experimentos foram realizadas capturas de imagens por meio de microscópio óptico de luz invertida para análises morfológicas das células desde o primeiro dia de tratamento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas as imagens obtidas das culturas durante todos os 7 dias de estimulação, sendo feita uma foto de cada tempo e o seu respectivo controle. As figuras apresentadas abaixo referem-se ao primeiro e sétimo dia de estimulação das culturas de astrócitos (Figura 2) e linhagem C6 de glioma (Figura 3).

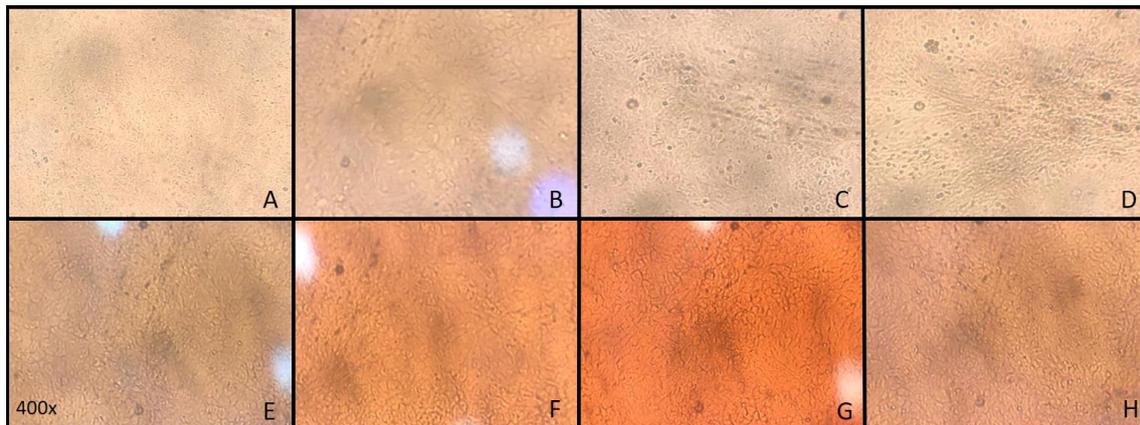


Figura 2 – Imagens das células em cultivo primário de astrócito no primeiro dia (A, B, C e D) e no sétimo dia de estimulação magnética (E, F, G e H). A) controle total; B) 5 minutos de estímulo; C) 15 minutos de estímulo; D) 30 minutos de estímulo; E) controle total F) 5 minutos de estímulo; G) 15 minutos de estímulo; H) 30 minutos de estímulo.

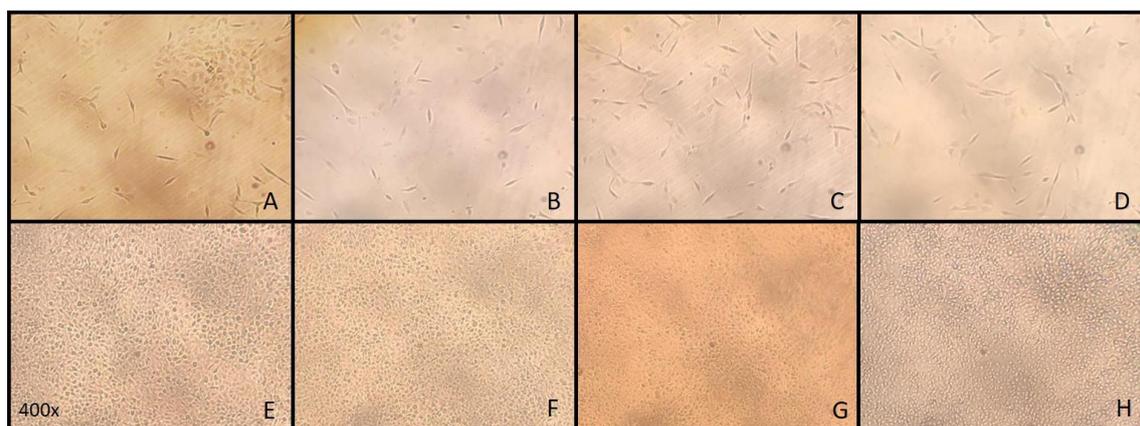


Figura 3 – Imagens das células em cultivo primário de linhagem C6 de glioma no primeiro dia (A, B, C e D) e no sétimo dia de estimulação magnética (E, F, G e H). A) controle total; B) 5 minutos de estímulo; C) 15 minutos de estímulo; D) 30 minutos de estímulo; E) controle total F) 5 minutos de estímulo; G) 15 minutos de estímulo; H) 30 minutos de estímulo.

Na cultura de astrócitos, a partir da análise morfológica não encontrou-se diferenças entre os estimulados e o controle. Além disso, não observou-se diferença entre os tempos de estimulação comparando-os entre si. Estes resultados satisfazem as expectativas visto que, são células normais que acabam sendo atingidas durante as estimulações terapêuticas e que espera-se que não sofram ações destes estímulos, mantendo-se inalteradas.

Na cultura de linhagem C6 de glioma, as células mudaram a sua conformação ao longo dos dias, mas todos os tempos de estímulo apresentaram a mesma variação. Esta mudança de conformação foi secundária ao aumento no número celular que ocorre naturalmente ao longo do cultivo, a EME (estimulação magnética estática) não modificou a morfologia celular e, aparentemente não interferiu no crescimento celular. Neste caso o ideal seria que os estímulos, de alguma maneira, reduzissem o número celular já que são células patológicas.

4. CONCLUSÃO

Podemos concluir que, em termos morfológicos, a estimulação magnética não causou alterações celulares nas culturas, independente do tempo em que este estímulo foi realizado. Tanto as células obtidas por cultivo primário e as de linhagem de glioma não demonstraram ter sido afetadas morfológicamente pela EM.

O fato dos astrócitos saudáveis não apresentarem morfologias diferenciadas do grupo controle frente ao estímulo, aponta resultados positivos, uma vez que não há o intuito de alterá-las pelo tratamento. Isso também é esperado de células de origem tumoral, pois a finalidade das estimulações não é promover uma mudança estrutural nessas células.

Os resultados obtidos sugerem a necessidade de novos ensaios para demonstrar efeitos no metabolismo e bioquímica dessas células. Mais experimentos estão em andamento e serão realizadas outras análises para avaliar a viabilidade celular de culturas submetidas a esse modelo de tratamento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHERNY, N. I.; CHRISTAKIS, N. A. **Oxford textbook of palliative medicine**. New York. Oxford university press, 2011.

CHWISTEK, M. Recent advances in understanding and managing cancer pain. **F1000Research**, v.6, 2017.

HORRAX, G. Experiences with cortical excisions for the relief of intractable pain. **Surgery**, v. 20, p. 593-602, 1946.

KNOTKOVA, H. *et al.* Transcranial direct current stimulation (tDCS): What pain practitioners need to know. **Practical Pain Management**, v. 2, p. 58-65, 2015.

NIJS, J. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor as a driving force behind neuroplasticity in neuropathic and central sensitization pain: a new therapeutic target? **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 19, n. 4, p. 565-576, 2015.

NIZARD, J. *et al.* Interest of repetitive transcranial magnetic stimulation of the motor cortex in the management of refractory cancer pain in palliative care: Two case reports. **Palliative medicine**, v. 29, n. 6, p. 564-568, 2015.

PAICE, J. A.; FERRELL, B. The management of cancer pain. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 3, p. 157-182, 2011.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 1, p. 5-29, 2015.