

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Martina Caroline Staphenhorst

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA
ESTÁTICA EM MODELO *IN VITRO* DA DOENÇA DE PARKINSON**

Porto Alegre

2018

Martina Caroline Stapenhorst

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA
ESTÁTICA EM MODELO *IN VITRO* DA DOENÇA DE PARKINSON**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientador: Prof.^a Dra. Elizabeth Obino Cirne-Lima

Coorientador: Prof. Dr. Fábio Klamt

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Stapenhorst, Martina Caroline

Avaliação do efeito neuroprotetor da estimulação magnética estática em modelo in vitro da doença de Parkinson / Martina Caroline Stapenhorst. -- 2018.

54 f.

Orientadora: Elizabeth Obino Cirne-Lima.

Coorientador: Fábio Klamt.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Doença de Parkinson. 2. Células SH-SY5Y. 3. Estimulação Magnética Estática. 4. 6-OHDA. 5. Neuroproteção. I. Obino Cirne-Lima, Elizabeth, orient. II. Klamt, Fábio, coorient. III. Título.

Martina Caroline Stapenhorst

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA
ESTÁTICA EM MODELO *IN VITRO* DA DOENÇA DE PARKINSON**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Laura Silveira Ayres - HCPA

Dra. Paula Barros Terraciano - HCPA

Prof.^a Dra. Elizabeth Obino Cirne-Lima - UFRGS

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho indica o término de uma jornada que teve início em 2014, quando dei meus primeiros passos dentro da universidade. Durante estes anos, só tenho a agradecer a todos que cruzaram meu caminho e que, de alguma maneira, deixaram um pouquinho de si em minha vida.

Aos meus maiores ídolos, meus pais Marguit e Hilmar, o meu mais sincero obrigada. À minha mãe, que estendeu suas preocupações e cuidados às células, e que não me deixou fraquejar nem por um momento. Ao meu pai, que sempre foi meu exemplo e me ensinou que “nada assenta tão bem na frente do vencedor como uma coroa de modéstia”. E ao meu irmão Matheus, “a parte inteligente da família”, que dividiu belos momentos comigo durante a graduação. Amo vocês!

Às minhas “chefinhas” do coração, Betty e Fernanda, que me ensinaram tudo o que eu sei sobre ciência. Obrigada por acreditarem em mim e por acompanharem meus passos ao longo desta jornada, que foi deveras florida ao lado de vocês.

Ao mitocondriólogo, professor e amigo querido, Fábio Klamt, por embarcar neste trabalho comigo e por tudo o que fez por mim ao longo da graduação. Muito obrigada!

À Helouise, minha mentora na bancada e amiga ao longo destes anos de Iniciação Científica. Sem ti, este trabalho não seria possível!

A todas as meninas do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, pela amizade, companheirismo, risadas e ensinamentos. Vocês foram fundamentais para a execução deste trabalho, e, mais ainda, para minha formação profissional e pessoal. Obrigada por fazerem parte disso!

Às meninas do Laboratório de Bioquímica Celular, Fernanda e Maria, por toda a ajuda prestada, pessoalmente ou à distância. Este trabalho também é de vocês!

A todos os amigos que percorreram esta jornada comigo e tornaram tudo muito mais divertido, muito obrigada! Aos meus amigos de Santa Cruz, em especial à Tininha e à Mirella, que entenderam minha ausência e permaneceram ao meu lado desde os anos de colégio. Aos meus amigos da capital, que me mostraram o verdadeiro valor de uma amizade e que sobreviveram aos “perrengues” da graduação comigo. À Schauana, minha duplinha, pela amizade e companheirismo inestimáveis, e ao Alexandre, pelos almoços no RU, risadas, conversas e micos típicos dos “colonos do interior”. Vocês são demais!

E por fim, mas não menos importante, a Deus, com quem eu converso todas as noites.

“Foi o tempo que perdeste com tua rosa que a fez tão importante”.

(Antoine de Saint-Exupéry - O Pequeno Príncipe)

RESUMO

Técnicas de estimulação magnética cerebral têm sido amplamente utilizadas no tratamento de doenças do sistema nervoso, como a doença de Parkinson (DP), mas seu real mecanismo de ação e efeito em modelos celulares carece de maiores investigações, principalmente no que concerne à DP. As limitações impostas pelos tratamentos farmacológicos têm colocado em foco estudos que avaliam neuroproteção sobre modelos celulares da doença, e a utilização de campos magnéticos estáticos para este fim não está descrita. Sendo assim, o objetivo principal deste trabalho foi investigar os efeitos neuroprotetores da Estimulação Magnética Estática (EME) em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinoico (AR) com citotoxicidade induzida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA). As células foram plaqueadas em placas de 24 poços a uma densidade de 5×10^4 células por poço e passaram pelo protocolo de diferenciação celular que utiliza $10 \mu\text{M}$ de AR durante 7 dias. No dia 7, as células foram expostas à EME durante 24 horas em um suporte para placa de cultura com 6 ímãs cilíndricos NeFeB (neodímio-ferro-boro) a uma intensidade de 0,3 T e no dia 8 estas células foram tratadas com $15 \mu\text{M}$ de 6-OHDA por 24 horas. No dia 9, foram avaliadas a viabilidade celular pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), a morte celular pela coloração com iodeto de propídeo (PI) e Hoescht_33342 (HO) e a densidade de neuritos emitidos pelas células diferenciadas através do *plugin* “*Neurongrowth*” do *software ImageJ*. Os grupos de tratamento foram divididos em: grupo controle; grupo 6-OHDA; grupo EME e grupo EME + 6-OHDA. O protocolo de diferenciação celular foi realizado com sucesso, sendo visualizada a projeção dos neuritos pelas células em análise de dia 7. O estabelecimento do modelo da DP *in vitro* por citotoxicidade com 6-OHDA foi confirmado através do ensaio de MTT, em que células que receberam a substância tiveram sua viabilidade diminuída ($p < 0,05$) em comparação com as que não foram expostas. Foi observado um aumento na morte celular do grupo que foi exposto anteriormente à EME e posteriormente à 6-OHDA em comparação com o grupo que não sofreu o protocolo de estimulação magnética ($p < 0,05$). A densidade de neuritos foi similar em todos os grupos de tratamento. Os resultados encontrados apontam para uma possível sensibilização das células à 6-OHDA quando a EME é aplicada previamente. Estes achados ilustram a importância de estudos que avaliam a utilização de campos magnéticos estáticos sobre modelos de células neuronais, principalmente no que diz respeito à intensidade do campo aplicado, ao tempo de exposição e ao momento em que a estimulação magnética é realizada. A realização de novos estudos que utilizem a técnica sob diferentes condições no modelo celular em questão é fundamental para a melhor compreensão de sua possível atividade neuroprotetora e também de seu mecanismo de ação.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Células SH-SY5Y. Estimulação Magnética Estática. 6-OHDA. Neuroproteção.

ABSTRACT

Techniques of magnetic stimulation of the brain have been widely used in the treatment of nervous system's diseases, such as Parkinson's Disease (PD), but its real mechanism of action and effects in cellular models need further investigation, especially in PD. Limitations imposed by pharmacological treatments have brought studies of neuroprotection in cellular models of the disease o focus, and the use of static magnetic fields to this purpose is not described. Therefore, the main objective of this study was to investigate the neuroprotective effects of Static Magnetic Stimulation (SMS) in neuroblastoma SH-SY5Y retinoic acid (RA) differentiated cells with 6-hydroxidopamine (6-OHDA) induced cytotoxicity. Cells were plated in a 24 well plate in a density of 5×10^4 cells per well and treated with $10 \mu\text{M}$ of AR for 7 days during the differentiation protocol. On day 7, cells were exposed to SMS for 24h in a culture plate support with 6 NdFeB (neodimium-iron-boro) magnets in an intensity of 0,3 T and on day 8 cells were treated with $15 \mu\text{M}$ of 6-OHDA for 24h. On day 9, cell viability was evaluated by MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) assay, cell death by both propidium iodide (PI) and Hoescht_33342 (HO) staining, and neurite density of the differentiated cells was evaluated by the *plugin "Neurongrowth"* of *ImageJ software*. Treatment groups were divided in: control group (only RA); 6-OHDA group (RA + 6-OHDA); SMS (RA + SMS) group and SMS + 6-OHDA (RA, SMS and 6-OHDA) group. Cell differentiation protocol was successfully accomplished, as neurite projections of the cells could be visualized in day 7. Establishment of the PD *in vitro* model by 6-OHDA cytotoxicity was confirmed by MTT assay, in which cells treated with the substance had decreased viability ($p < 0,05$) compared with cells that were not exposed. An increase in cell death was observed in the group previously exposed to SMS and subsequently to 6-OHDA in comparison to the group in wich the magnetic stimulation was not applied ($p < 0,05$). Neurite density was similar in all treatment groups. The results indicate a possible sensitivity of the cells to 6-OHDA when SMS is previously applied. These findings demonstrate the relevance of studies that apply static magnetic fields on neuronal cellular models, especially with regard to intensity of the field applied, to the time of exposure and to the moment in which the magnetic stimulation is performed. New studies using this technique under different conditions on the same cellular model are essential to achieve a better comprehension of its possible neuroprotective effects and also its mechanism of action.

Keywords: Parkinson's Disease. SH-SY5Y cells. Static Magnetic Stimulation. 6-OHDA. Neuroprotection.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Circuito Cerebral da doença de Parkinson..... | 12 |
| Figura 2 – Técnica de Estimulação Magnética Transcraniana..... | 14 |
| Figura 3 – Quadro comparativo entre os modelos celulares SH-SY5Y..... | 17 |

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA – 6-hidroxidopamina

AR – Ácido Retinoico

DA – Dopamina

DAT – *Dopamine Transporter*

DP – Doença de Parkinson

ECNI – Estimulação Cerebral Não-Invasiva

EMT – Estimulação Magnética Transcraniana

EMTr – Estimulação Magnética Transcraniana Repetitiva

EMTe – Estimulação Magnética Transcraniana Estática

EME – Estimulação Magnética Estática

SNC – Sistema Nervoso Central

SNpc – *Substantia Nigra Pars Compacta*

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1 | DOENÇA DE PARKINSON | 11 |
| 1.2 | ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA | 13 |
| 1.3 | MODELOS <i>IN VITRO</i> DA DOENÇA DE PARKINSON | 16 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 18 |
| 3 | OBJETIVOS | 19 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 19 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 19 |
| 4 | ARTIGO CIENTÍFICO | 20 |
| 5 | CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS | 37 |
| | REFERÊNCIAS | 38 |
| | ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA <i>NEUROSCIENCE LETTERS</i> | 40 |

1 INTRODUÇÃO

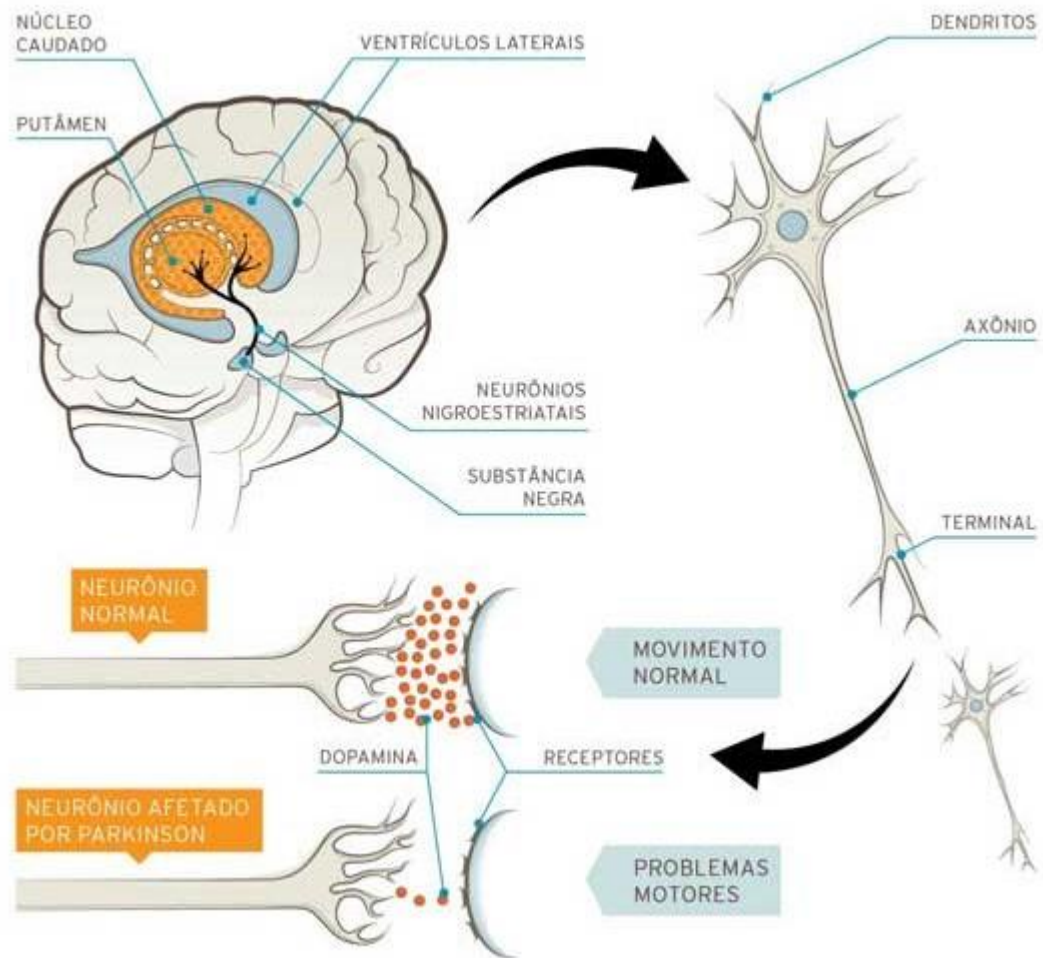
1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) foi descrita pela primeira vez por James Parkinson em 1817, em sua monografia intitulada *An Essay on the Shaking Palsy* (CORTI et al., 2005). Apesar da descrição detalhada da DP ter sido realizada há pouco mais de duzentos anos, sua contextualização e conceituação continuam progredindo, nesta que é a doença neurodegenerativa progressiva mais comum depois da doença de Alzheimer (KALIA; LANG, 2015). A idade é o maior fator de risco para o desenvolvimento esporádico da doença e estima-se uma prevalência de cerca de 6 milhões de pacientes na população entre os 60 anos (LESAGE; BRICE, 2009; MULLIN; SCHAPIRA, 2015).

No Sistema Nervoso Central (SNC), a morte de neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra pars compacta* (SNpc) é o gatilho inicial da DP, estando os níveis de dopamina (DA) reduzidos em 60 a 70% no momento do diagnóstico, quando sintomas clássicos da doença já estão presentes (MULLIN; SCHAPIRA, 2015). A área mais afetada da SNpc é a que engloba a camada ventrolateral, que contém neurônios que se projetam até o putâmen dorsal do núcleo estriado (Figura 1). A deficiência de DA resultante leva a disfunções nos movimentos, manifestadas pelos sintomas motores parkinsonianos típicos, como bradicinesia, tremor em repouso, rigidez e instabilidade postural. Sintomas não-motores, como distúrbios do sono, dor, fadiga e disfunções autonômicas são comuns nos estágios iniciais da doença, podendo preceder as disfunções motoras em mais de uma década, reduzindo significativamente a qualidade de vida do paciente (KALIA; LANG, 2015).

Além da diminuição considerável nos níveis de DA, a DP também é resultado do acúmulo de agregados anormais da proteína α -sinucleína em neurônios dopaminérgicos sobreviventes (LESAGE; BRICE, 2009). Esta proteína, quando em conformação errônea, torna-se insolúvel e agrega-se, formando inclusões no corpo celular ou ramificações nos neurônios. Estes emaranhados proteicos são conhecidos como corpos de Lewy e neuritos de Lewy, respectivamente, e, juntamente com a presença de degeneração da SNpc, formam o diagnóstico padrão ouro *post-mortem* da DP. Apesar de ser um critério diagnóstico, a associação da patologia de Lewy com a patogênese da doença permanece muito pouco compreendida (KALIA; LANG, 2015).

Figura 1 - Circuito Cerebral da doença de Parkinson



Legenda: Esquema ilustrativo da fisiopatologia da doença de Parkinson, demonstrando as regiões cerebrais envolvidas e as consequências da diminuição da quantidade de dopamina.
 Fonte: Pivetta, 2011, p. 18.

Outros fatores, como estresse oxidativo, disfunções mitocondriais e apoptose também estão associados à morte celular observada na DP, muito embora a sua etiologia permaneça desconhecida (LESAGE; BRICE, 2009). Hoje, acredita-se que a doença seja resultado de uma complicada inter-relação entre ambiente e genética, em um contexto claramente multifatorial. Alguns fatores de risco estabelecidos para a doença são idade, gênero e etnia, além de exposições ambientais a pesticidas e a vida no campo. A prevalência e a incidência da DP aumentam exponencialmente com a idade, alcançando um pico aos 80 anos. Homens são mais atingidos que mulheres, em uma proporção de 3:2, e populações de origem hispânica apresentam a maior taxa de incidência da doença nos Estados Unidos (EUA) (KALIA; LANG, 2015). A exposição a pesticidas e a vida no campo também aumentam o risco, enquanto o consumo de café e o tabagismo diminuem, parecendo exercer um efeito protetivo (KALIA; LANG, 2015; LESAGE; BRICE, 2009).

O tratamento dos pacientes com DP visa aliviar os sintomas motores através da administração de fármacos que aumentam as concentrações de DA ou que estimulem diretamente os receptores dopaminérgicos (KALIA; LANG, 2015). A administração oral de levodopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina), um precursor de dopamina, alivia a maior parte dos sintomas motores. Porém, seu uso crônico pode levar ao desenvolvimento de movimentos involuntários, chamados de discinesias, pela maior parte dos pacientes, o que torna o manejo e o controle ainda mais difíceis (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Neste contexto, muitas pesquisas estão sendo direcionadas para o desenvolvimento de fármacos que atuem na prevenção da degeneração de neurônios dopaminérgicos. Apesar dos esforços, os tratamentos disponíveis são somente para os casos sintomáticos, não impedindo ou retardando a morte celular expressiva, característica da DP (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). A eficácia e a tolerabilidade limitadas das terapias farmacológicas deram espaço para o desenvolvimento de terapias alternativas, ditas não-farmacológicas, especialmente as de estimulação cerebral, como a Estimulação Magnética Transcraniana, que tem sido descrita como alternativa terapêutica para o paciente parkinsoniano (FREGNI; PASCUAL-LEONE, 2007; MORRIN et al., 2017).

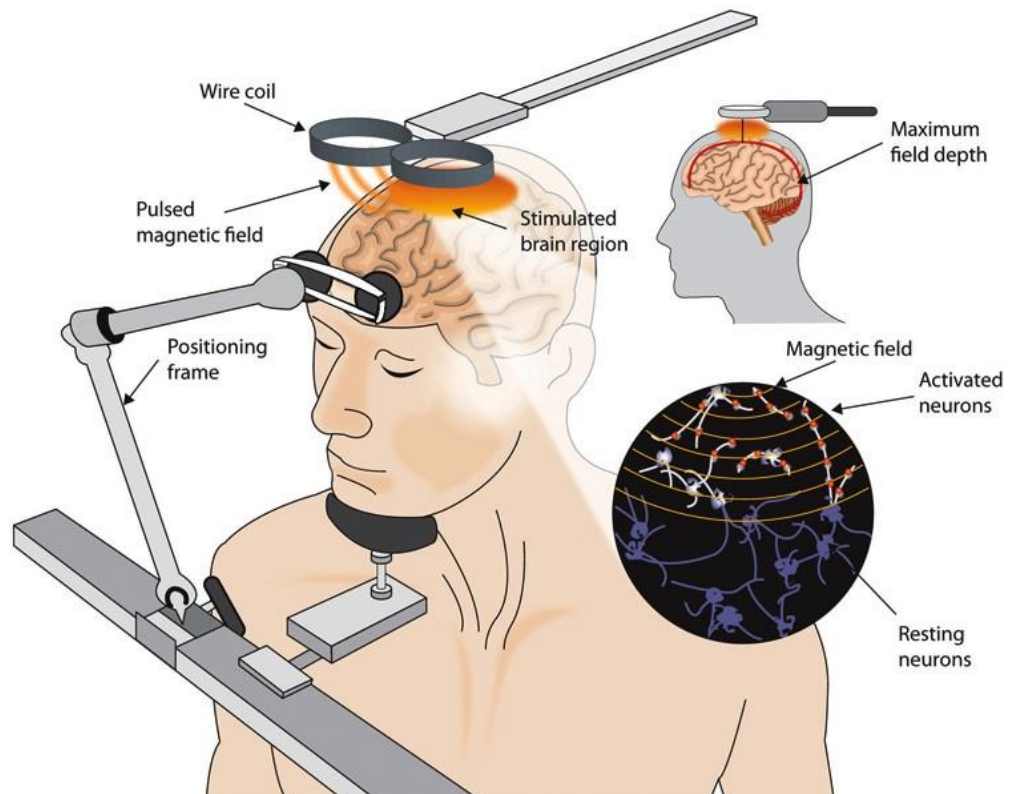
1.2 ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA

Nas últimas décadas, estudos eletrofisiológicos têm ampliado o entendimento da atividade cerebral em condições normais e patológicas, contribuindo com informações importantes para o desenvolvimento de terapias e pesquisas, sendo a estimulação cerebral tema de estudos neurológicos, psiquiátricos e psicológicos. As técnicas de estimulação cerebral não-invasivas (ECNI) oferecem risco mínimo ou nenhum ao paciente, e têm demonstrado resultados significativos a partir de correntes de estimulação focal em áreas do córtex cerebral (NOOHI; AMIRSALARI, 2016).

Entre as técnicas desenvolvidas está Estimulação Magnética Transcraniana (EMT), que é antiga, tendo sido desenvolvida como um método de ECNI e introduzido pela primeira vez por Barker et al. em 1985. De maneira simplificada, a EMT é a indução de uma corrente elétrica no córtex cerebral através de um campo magnético externo ao cérebro (NOOHI; AMIRSALARI, 2016). O campo magnético é gerado por uma bobina acoplada a um gerador, e a corrente por ele produzida é capaz de despolarizar membranas neuronais. Este estímulo magnético atinge cerca de 2cm de profundidade, dependendo da bobina utilizada (ZANGEN et al., 2005). Quando a EMT é aplicada repetidamente ou em pulsos (EMT Repetitiva- EMTr) ela

consegue modular a excitabilidade cortical, de forma a aumentá-la ou diminuí-la, tendo impacto direto no comportamento e no potencial terapêutico. A estimulação magnética do córtex é indolor, de fácil utilização e não necessita de contato direto com o couro cabeludo (BARKER; JALINOUS; FREESTON, 1985; ROSSI et al., 2009) (Figura 2).

Figura 2 - Técnica de Estimulação Magnética Transcraniana



Legenda: A EMT aplicada na clínica, mostrando a utilização de campo magnético em regiões cerebrais de interesse.
Fonte: Forte, 2015.

A utilização da EMT tem se dirigido para as mais diversas áreas, como no tratamento da depressão, da epilepsia, da dor neuropática, acidente vascular encefálico e da doença de Parkinson. Na DP, a técnica está sendo estudada como uma intervenção para a melhora dos sintomas motores e não-motores dos pacientes, sendo os benefícios observados de pequena a média magnitude (VONLOH; CHEN; KLUGER, 2013). Desta forma, esta tecnologia de ECNI tem ganhado espaço frente aos tratamentos farmacológicos e às terapias comportamentais, que podem causar efeitos adversos graves ou moderados e que dependem da cooperação do paciente e da capacidade do terapeuta, respectivamente (FREGNI; PASCUAL-LEONE, 2007).

Os efeitos da ECNI não são limitados diretamente à região cerebral focalizada, podendo se espalhar através de sinapses para regiões corticais distantes e até mesmo estruturas

subcorticais, dependendo da força das conexões neuronais e do nível de atividade de redes neurais específicas (FREGNI; PASCUAL-LEONE, 2007). A utilização de EMTr no córtex pré-frontal de pacientes com DP resultou em liberação de dopamina na região da cabeça do núcleo estriado, resultado demonstrado por Strafella et al. (2001¹ apud FREGNI; PASCUAL-LEONE, 2007). Em estudo de Miranda et al. (2006² apud FREGNI; PASCUAL-LEONE, 2007), pacientes que receberam 8 sessões de EMTr a uma frequência de 25 Hz durante 4 semanas tiveram uma melhora gradual no caminhar e no movimento das mãos, sendo o benefício observado por mais de 1 mês após o tratamento.

Apesar dos resultados promissores que demonstram os efeitos da EMTr, ela ainda é uma técnica considerada desconfortável, e por isso alguns cientistas estão fazendo uso de Estimulação Magnética Transcraniana estática (EMTe) por ser mais confortável e segura. A estimulação é feita através da colocação de um ímã de terras raras (neodímio-ferro-boro ou samário-cobalto) sobre o córtex motor humano. Sugere-se que a EMTe não afete a excitabilidade da membrana de neurônios piramidais, mas induza mudanças a nível sináptico (OLIVIERO et al., 2011). Diferentemente da EMTr, os campos magnéticos estáticos não induzem correntes elétricas, e seus efeitos biológicos podem ser classificados de acordo com a intensidade do campo magnético, a saber: fraco (<1mT), moderado (1mT a 1T), forte (1T a 5T) e ultraforte (>5T) (DESIDÉRIO, 2017). Estes campos podem regular o movimento de moléculas carregadas, e a utilização dos magnetos pode ser controlada de maneira mais eficaz, em uma técnica que não requer utilização de substâncias químicas (KIM et al., 2016).

Estudos que avaliam os efeitos de Estimulação Magnética Estática (EME) na faixa moderada foram examinados em vários biosistemas, principalmente em células nervosas, a fim de se compreender seu mecanismo de ação (MEDEIROS, 2017). Linhagens celulares de neuroblastoma humano têm sido amplamente utilizadas nos estudos que avaliam os efeitos do campo magnético (TRILLO et al., 2013). Entretanto, apesar de evidências pré-clínicas que utilizam modelos animais ou *in vitro*, e das evidências clínicas que utilizam técnicas de estimulação cerebral, seus efeitos celulares necessitam de melhor investigação, principalmente no que concerne à DP.

¹ STRAFELLA et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation of the human pre-frontal cortex induces dopamine release in the caudate nucleus. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 15, RC157, 2001.

² MIRANDA et al. Modeling the current distribution during transcranial direct current stimulation. **Clinical Neurophysiology**, v. 117, n. 7, p. 1623-1629, 2006.

1.3 MODELOS *IN VITRO* DA DOENÇA DE PARKINSON

A fim de se estudar eventos da doença, seu início e sua progressão, alguns modelos experimentais *in vitro* da DP foram desenvolvidos com o intuito de reproduzir as características dopaminérgicas e fenotípicas da doença em um ambiente controlado. Estes modelos facilitam as investigações dos mecanismos patofisiológicos celulares e moleculares relacionados com a degeneração de neurônios dopaminérgicos, além de auxiliarem em estudos que buscam novos potenciais terapêuticos. Contudo, eles ainda apresentam limitações, principalmente no que diz respeito à mimetização da complexidade do SNC em um ambiente *in vitro* (LOPES et al., 2017).

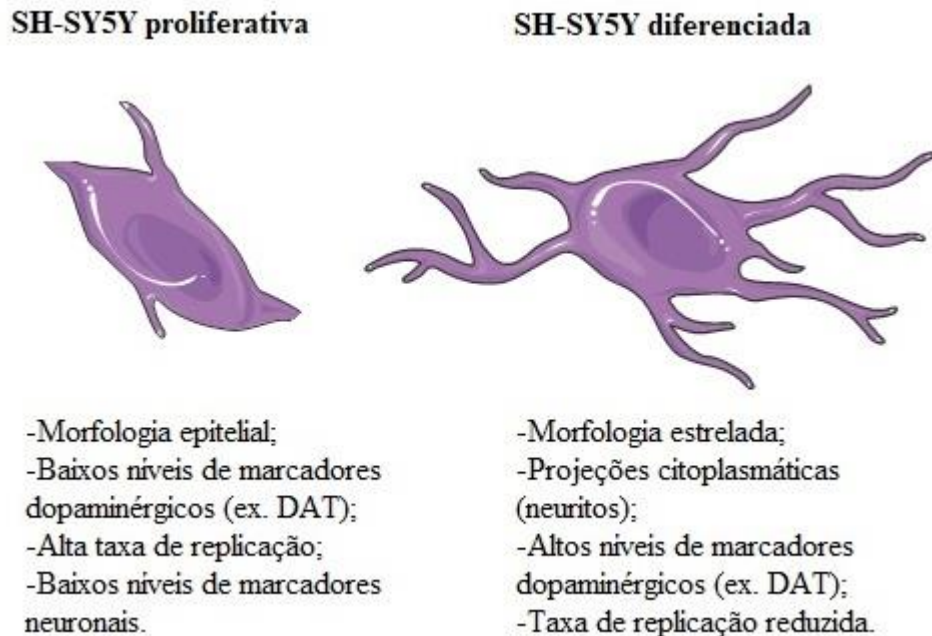
Um dos modelos dopaminérgicos *in vitro* mais utilizados para pesquisa da DP é o modelo da linhagem celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Esta linhagem deriva de um sítio metastático isolado da medula óssea de uma menina de 4 anos, portadora de um neuroblastoma. Quando em cultura, as células do tumor apresentam morfologia epitelial e pouco citoplasma. Além disso, por expressarem baixos níveis de marcadores dopaminérgicos como o transportador de dopamina (DAT) e enzimas como a tirosina hidroxilase, envolvida na síntese da DA, estas células não conseguem sintetizar e liberar este neurotransmissor, o que as torna um modelo amplamente utilizado para estudos da DP (LOPES et al., 2017).

Entretanto, as células SH-SY5Y proliferativas não exibem características neuronais. Sua alta taxa de replicação, estágio de diferenciação precoce e baixa presença de marcadores neuronais coloca em xeque sua utilização como modelo para a DP. Como alternativa a este empecilho, foi desenvolvido um protocolo de diferenciação celular que visa transformar células proliferativas desta linhagem em células com perfil neuronal dopaminérgico, e que apresentem morfologia e características bioquímicas de neurônios dopaminérgicos (LOPES et al., 2010). O processo de diferenciação, que utiliza ácido retinoico (AR), resulta em um fenótipo que assemelha as células a neurônios, o que pode ser visualizado através de projeções citoplasmáticas (neuritos) emitidos pelas células (SCHÖNHOFEN et al., 2015). Após a diferenciação, a proliferação celular diminui e a expressão de marcadores dopaminérgicos, como o DAT, aumenta (LOPES et al., 2017) (Figura 3).

Após a diferenciação das células, a patologia da DP pode ser replicada *in vitro* através da utilização da neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA). A 6-OHDA é um metabólito hidroxilado da DA que exibe afinidade pelo DAT, e tal fato resulta em sua alta captação por neurônios catecolaminérgicos *in vivo*. Quando dentro do neurônio, a 6-OHDA acumula-se no citoplasma e causa danos celulares. Apesar de diversos estudos, os mecanismos através dos quais esta substância exerce seus efeitos neurotóxicos ainda não estão completamente

elucidados. Além disso, sua auto oxidação produz substâncias como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o que está relacionado com sua citotoxicidade. Esta instabilidade molecular costuma ser driblada com a utilização de antioxidantes durante o preparo da 6-OHDA, como o ácido ascórbico, que deve ser preparado sempre no momento da utilização (LOPES et al., 2017).

Figura 3 - Quadro comparativo entre os modelos celulares SH-SY5Y



Legenda: Características morfológicas e bioquímicas das células SH-SY5Y proliferativas e diferenciadas utilizadas como modelos *in vitro* da doença de Parkinson.

Fonte: elaborada pela autora.

A entrada da 6-OHDA via DAT nas células, causando estresse oxidativo significativo, torna o modelo de células SH-SY5Y diferenciadas mais adequado para mimetizar o modelo de DP, visto que as células após diferenciação expressam mais marcadores dopaminérgicos como o DAT, ao contrário das células SH-SY5Y proliferativas, que não reproduzem, portanto, este fenômeno de morte celular observado *in vivo* (LOPES et al., 2017).

Contudo, a morte celular expressiva observada após a exposição das células à 6-OHDA dificulta os estudos que buscam o tratamento da DP *in vitro*. Desta forma, a ação de determinadas substâncias e tratamentos anteriormente ao dano com 6-OHDA costuma ser estudada para avaliação de seu efeito neuroprotetor nas células (LIANG et al., 2011; WEI et al., 2015).

2 JUSTIFICATIVA

Estimulação magnética é um procedimento que tem sido estudado como alternativa terapêutica a diversos processos crônicos, como depressão, epilepsia, dor neuropática e a Doença de Parkinson, principalmente por se tratar de uma metodologia de tratamento não-invasiva. Estudos clínicos prévios têm demonstrado uma melhora gradual de pacientes parkinsonianos que passaram por protocolo de estimulação magnética cerebral, refletindo na melhora do caminhar e no movimento das mãos. Entretanto, estudos que abordam os efeitos inter e intracelulares da estimulação magnética, principalmente a estática (EME) são escassos, e a utilização de modelos celulares *in vitro* da doença de Parkinson para a melhor compreensão da técnica não estão descritos. A dificuldade em se trabalhar com os modelos disponíveis se reflete, principalmente, na morte celular expressiva observada em decorrência da administração de compostos danosos às células. Como alternativa, a ação de determinadas substâncias ou intervenções, anteriormente ao dano celular, costuma ser estudada para avaliação de seu efeito protetor no modelo de estudo. Desta maneira, este Trabalho de Conclusão de Curso buscou avaliar a possível ação neuroprotetora da EME em um modelo que mimetizasse a doença de Parkinson *in vitro*, contribuindo para a compreensão do funcionamento intrínseco da técnica e da resposta das células frente ao tratamento.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito neuroprotetor da estimulação magnética estática em modelo *in vitro* da doença de Parkinson.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Promover a diferenciação de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y em células com perfil neuronal;
- b) Validar o modelo de Parkinson *in vitro* através da utilização de 6-OHDA;
- c) Avaliar a viabilidade celular através do ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio);
- d) Avaliar morte celular através das colorações de Hoescht_33342 e Iodeto de Propídeo;
- e) Avaliar a densidade de neuritos emitidos pelas células.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Estimulação magnética estática prévia sensibiliza células em modelo *in vitro* da doença de Parkinson

Martina Caroline Stapenhorst^a, Helouise Richardt Medeiros^{ab}, Fernanda dos Santos de Oliveira^a, Iraci Lucena da Silva Torres^b, Paulo Roberto Stefani Sanches^c, Fábio Klamt^d e Elizabeth Obino Cirne-Lima^{a*}

^aLaboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil

^bLaboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Estudos Pré-Clínicos, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

^cServiço de Pesquisa e Desenvolvimento em Engenharia Biomédica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil

^dLaboratório de Bioquímica Celular, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

***AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA**

Elizabeth Obino Cirne-Lima (cirnelima@hcpa.edu.br)

Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90.035-903 - Porto Alegre, RS, Brasil

Fone +55 51 3359-8989

RESUMO

Técnicas de estimulação magnética cerebral têm sido amplamente utilizadas no tratamento de doenças do sistema nervoso, como a doença de Parkinson (DP), mas seu real mecanismo de ação e efeito em modelos celulares carece de maiores investigações, principalmente no que concerne à DP. Além disso, o estudo de tratamentos neuroprotetores sobre modelos celulares da doença vem ganhando espaço, e a utilização de campos magnéticos estáticos para este fim ainda não está descrita. Assim, o objetivo principal deste trabalho foi investigar os efeitos neuroprotetores da Estimulação Magnética Estática (EME) em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciado com ácido retinoico (AR) com toxicidade induzida por 6-OHDA. As células foram expostas por 24h à EME em um suporte para placas de 24 poços com ímãs cilíndricos NdFeB (neodímio-ferro-boro) a uma intensidade de 0,3 T e posteriormente tratadas com 6-OHDA. A diferenciação das células foi confirmada pela projeção de neuritos e estes também foram avaliados entre os diferentes grupos de tratamento. A viabilidade celular foi avaliada a partir do ensaio de MTT e a morte celular pela coloração com iodeto de propídeo (PI) e Hoescht_33342 (HO). A EME aplicada anteriormente ao tratamento com 6-OHDA aumentou a morte celular em comparação com o grupo que não sofreu o protocolo de estimulação magnética. Tal resultado aponta para uma possível sensibilização das células à 6-OHDA quando a EME é aplicada previamente. Estes achados ilustram a importância de estudos que avaliam a utilização dos campos magnéticos estáticos sobre modelos de células neuronais, para melhor compreensão de seu mecanismo de ação.

Palavras-chave: 6-OHDA. Células SH-SY5Y. Estimulação Magnética Estática. Neuroproteção.

INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na *substantia nigra pars compacta* (SNPc) com consequente diminuição nos níveis de dopamina (DA), o que leva à manifestação de sintomas motores característicos da doença, como rigidez, tremor e dificuldade de iniciação dos movimentos. O mal dobramento da proteína α -sinucleína e seu consequente acúmulo nos neurônios dopaminérgicos sobreviventes também marcam a fisiopatologia da DP. Estes emaranhados proteicos são conhecidos como corpos de Lewy, e servem como critério diagnóstico *post-mortem* da doença [1]. Apesar da etiologia da DP permanecer desconhecida, processos como estresse oxidativo, apoptose e disfunções mitocondriais estão amplamente descritos na literatura [2]. Pela falta de terapias neuroprotetoras, o tratamento da DP permanece sintomático, e a administração oral de L-3,4-dihidroxi-fenilalanina (levodopa), um precursor de DA, alivia temporariamente a maior parte dos sintomas motores, mas leva ao surgimento de movimentos involuntários (discinesia). Porém, novos avanços na neurociência molecular trazem a ideia de que a perda neuronal observada na DP pode ser bloqueada, com o possível uso de estratégias neuroprotetoras [3].

As terapias farmacológicas para o tratamento da DP, de eficácia e tolerabilidade limitadas, abriram caminho para o desenvolvimento de terapias não farmacológicas, especialmente as de estimulação cerebral que utilizam campos magnéticos [4]. Um exemplo é a Estimulação Magnética Transcraniana (EMT), uma técnica que induz corrente elétrica no córtex cerebral através de um campo magnético externo ao cérebro, gerado por uma bobina acoplada a um gerador. Esta corrente é capaz de despolarizar membranas neuronais, e, quando aplicada de maneira repetitiva, consegue modular a excitabilidade cortical. Estudos com EMT em pacientes com DP mostram melhora gradual no caminhar e no movimento das mãos [5]. A EMT ainda é considerada desconfortável, e por isso cientistas estão estudando a Estimulação Magnética Transcraniana estática (EMTe), que não induz correntes, na qual a estimulação cerebral é feita através da colocação de um ímã sobre o córtex motor humano. Acredita-se que esta técnica não afete a excitabilidade da membrana de neurônios, mas induza mudanças em nível sináptico [6]. Neste contexto, estudos que avaliam os efeitos da Estimulação Magnética Estática (EME) em células nervosas são essenciais para a melhor compreensão de seu mecanismo de ação, sendo os campos magnéticos estáticos de faixa moderada (1mT a 1T) examinados em vários tipos celulares [7,8]. Porém, o uso da EME em modelos *in vitro* da DP não estão descritos, e não há avaliação de seu possível efeito neuroprotetor.

A neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) é um análogo hidroxilado da DA comumente utilizado para mimetizar a perda neuronal em modelos *in vivo* e *in vitro* da DP [3]. A 6-OHDA apresenta alta afinidade pelo transportador de dopamina (DAT), promovendo destruição seletiva de neurônios dopaminérgicos [9]. Dentro do neurônio, 6-OHDA acumula-se no citoplasma e causa danos celulares, e sua auto oxidação produz substâncias que causam estresse oxidativo, como o peróxido de hidrogênio, o que está relacionado com sua citotoxicidade [10]. Neste contexto, células da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y apresentam características dopaminérgicas e são amplamente utilizadas como modelo *in vitro* da DP para avaliação de agentes terapêuticos e protetores [9]. Entretanto, por não exibirem características neuronais, estas células não representam o melhor modelo de estudo possível para a DP. Visando transformar células proliferativas desta linhagem em células diferenciadas com perfil neuronal dopaminérgico, um protocolo de diferenciação que utiliza ácido retinoico (AR) pode ser empregado. A diferenciação resulta em células com fenótipo parecido com neurônios, que pode ser visualizado pela presença de projeções citoplasmáticas (neuritos) emitidos pelas células [11]. Após a diferenciação, as células SH-SY5Y têm sua proliferação diminuída e a expressão de marcadores dopaminérgicos como o DAT aumentada, sendo estresse oxidativo, disfunções mitocondriais e morte neuronal dependentes de DAT nestas células [12]. Assim, a exposição das células diferenciadas à 6-OHDA configura um melhor modelo para a DP *in vitro*. Todavia, a morte celular expressiva observada após a exposição das células à substância tornou comum a avaliação de tratamentos anteriores ao dano, com o objetivo de avaliar seus possíveis efeitos protetores [9]. Com isso, o presente estudo buscou investigar os efeitos protetores da estimulação magnética estática (EME) no modelo celular SH-SY5Y diferenciado com ácido retinoico (AR) com neurotoxicidade induzida por 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA).

MATERIAIS E MÉTODOS

CULTURA CELULAR

A linhagem de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC, Manassas, VA, EUA) foi cultivada em mistura 1:1 de meio Ham F12 e *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) (Life Technologies®, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO®, EUA) inativado termicamente, 1% de penicilina/estreptomicina (GIBCO®, EUA) e mantida em estufa a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o registro 17-0670.

Para o protocolo de diferenciação celular, as células foram cultivadas em placas de 24 poços (TPP®) a uma densidade de 5×10^4 células/poço em meio suplementado com 10% SFB. Após 24h (dia 1), o protocolo de diferenciação foi induzido pela diminuição de SFB do meio de cultura para 1%, acrescido de 10 μ M de ácido retinoico (AR) (*all-trans* ácido retinoico, Enzo®, East Farmingdale, NY, EUA) seguido de incubação por 7 dias [12]. O meio foi trocado nos dias 4 e 7, e as células foram utilizadas para experimentos a partir do dia 7 (Figura 1).

Todos os experimentos foram realizados quando as células apresentavam confluência de 75%, permitindo o correto desenvolvimento dos neuritos e garantindo o sucesso do protocolo de diferenciação. A solução estoque de AR foi preparada diluindo-se o pó em etanol absoluto, e sua concentração foi determinada utilizando-se $E^{M(351nm)} = 45000$ nos dias em que houve troca de meio [12]. O meio de cultura acrescido de AR foi preparado na semana de uso, sendo descartado após o período. As células foram visualizadas em microscópio de luz com contraste de fase a fim de diferenciar-se a morfologia das células proliferativas e das células diferenciadas.

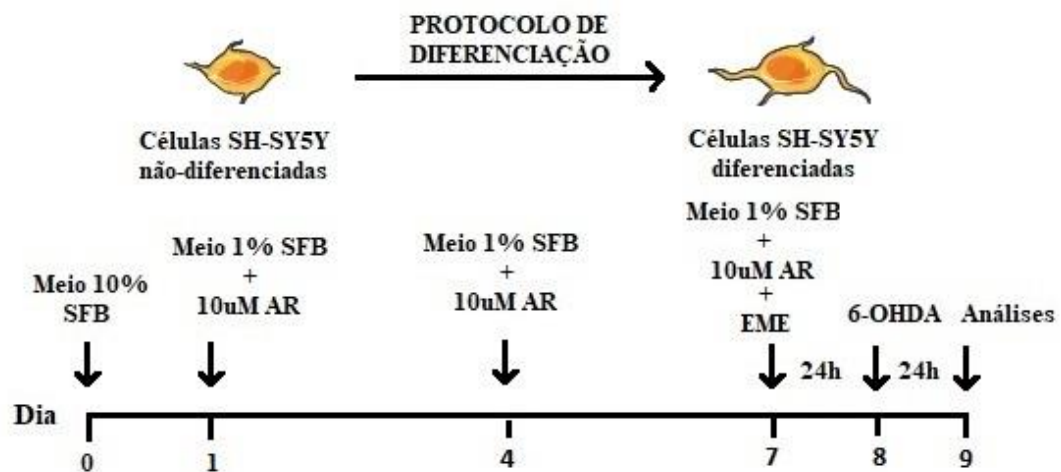


Figura 1. Desenho experimental- Protocolo de diferenciação das células SH-SY5Y, seguido da estimulação magnética estática (EME) previamente ao dano com 6-OHDA. As análises foram realizadas no dia 9, 24h após o dano.

Os experimentos foram conduzidos definindo-se os seguintes grupos: grupo controle, com células SH-SY5Y diferenciadas; grupo 6-OHDA, com células SH-SY5Y diferenciadas e expostas à 6-OHDA; grupo EME, com células SH-SY5Y diferenciadas expostas à estimulação magnética estática e grupo EME + 6-OHDA, com células SH-SY5Y diferenciadas, expostas à estimulação magnética estática prévia e à 6-OHDA.

ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA ESTÁTICA

A Estimulação Magnética Estática (EME) das células foi realizada utilizando-se um suporte para placa de cultura de 24 poços com ímãs cilíndricos NdFeB (neodímio-ferro-boro)

de 12mm de diâmetro e 6mm de altura, desenvolvido pelos grupos de pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre envolvidos no trabalho (Figura. 2). Cada suporte foi projetado com 6 ímãs separados adequadamente entre si, para evitar a interação entre os campos magnéticos, e a distância entre a placa de cultura e o suporte foi ajustada para garantir a força deste campo sobre as células. Um gaussímetro de efeito Hall (Kashava 5) foi utilizado para medir o campo magnético, e a intensidade escolhida foi de 0,3T por 24h de exposição celular à EME, de acordo com estudos já realizados pelo grupo [13]. O protocolo de EME foi realizado no dia 7.

CITOTOXICIDADE POR 6-OHDA

A 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Sigma Aldrich[®], EUA) foi preparada no momento do uso e diluída em ácido ascórbico 0,1%, a fim de evitar sua oxidação. A concentração de 6-OHDA escolhida foi o IC₅₀ (concentração que causa redução de 50% na viabilidade celular) de valor 15 μ M [14]. As células foram tratadas com a substância por 24h, no 8^o dia do protocolo de diferenciação (Figura 1).

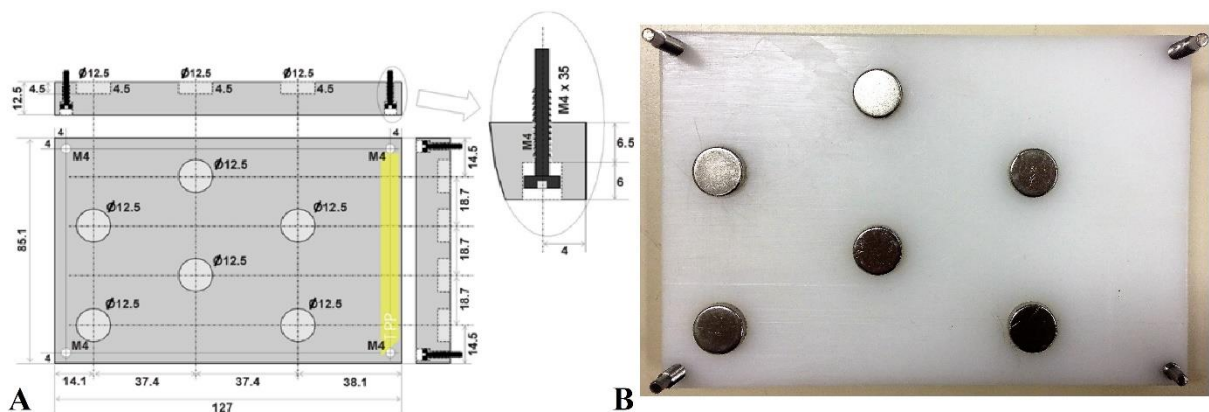


Figura 2. Desenho do suporte utilizado para estimulação magnética estática (EME), com a disposição dos ímãs de intensidade 0,3T e a distância regulada entre o dispositivo e a placa de cultura de 24 poços utilizada para os experimentos (A). Fotografia do suporte pronto para uso (B).

ENSAIO DE MTT

Após 24h em contato com a 6-OHDA, as células foram incubadas com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma Aldrich[®], USA). O MTT foi adicionado em concentração de 0,5 mg/mL nas células, sem que se retirasse o meio de cultura, seguido de 1 hora de incubação a 37°C [13]. Após, dimetil sulfóxido (DMSO) foi adicionado para a dissolução dos cristais de formazan produzidos pelas células e a absorbância foi determinada espectrofotometricamente a 540nm (Zenyth 200rt, Anthos[®]).

MORTE CELULAR

Células viáveis e em processo de morte foram identificadas após coloração com Hoescht_33342 (HO) (Sigma Aldrich[®], EUA) e Iodeto de Propídeo (PI) (Thermo Fisher[®], UK) (figura 7A). As células foram incubadas, durante 15 minutos, em solução contendo 5 mg/mL de PI e HO. Após, foram visualizadas em microscópio de fluorescência. Para a quantificação do número de células mortas/viáveis, cinco fotos por poço foram obtidas de maneira aleatória e analisadas através do *software ImageJ*. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de células mortas (coradas com PI) em relação às células viáveis (coradas com HO).

DENSIDADE DE NEURITOS

A densidade de neuritos foi avaliada através do *software ImageJ*, utilizando-se o *plugin Neurongrowth* [15]. Para tanto, as células foram visualizadas em microscópio de fluorescência, e de forma aleatória, foram feitas 5 fotos por poço. A densidade foi determinada dividindo-se o comprimento dos neuritos pelo número de células coradas com HO e os resultados expressos em unidade arbitrária (A.U.).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão em todos os experimentos, que foram realizados em triplicata por grupo. A significância estatística foi avaliada através de ANOVA de duas vias com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas no *software SPSS (Statistical for Social Science- versão 22.0 Inc., Chicago, IL, EUA)*.

RESULTADOS

DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS SH-SY5Y

O protocolo de diferenciação celular realizado com o intuito de transformar as células SH-SY5Y proliferativas em células diferenciadas com perfil neuronal foi executado com sucesso, fato que pode ser observado pela presença de neuritos que interconectam as células (Figura 3).

VALIDAÇÃO DA CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR 6-OHDA

Como mostrado na figura 4, o tratamento das células SH-SY5Y diferenciadas com 6-OHDA durante 24h causou diminuição na viabilidade celular, independentemente da realização da estimulação magnética estática. Na concentração de 15 μ M, a absorbância lida para o teste de

MTT das células que receberam 6-OHDA foi de $0,132 \pm 0,009$ enquanto que este valor foi de $0,209 \pm 0,01$ ($p=0,00$) para as células que não receberam a substância, validando, portanto, o modelo *in vitro* da doença de Parkinson utilizado no trabalho.

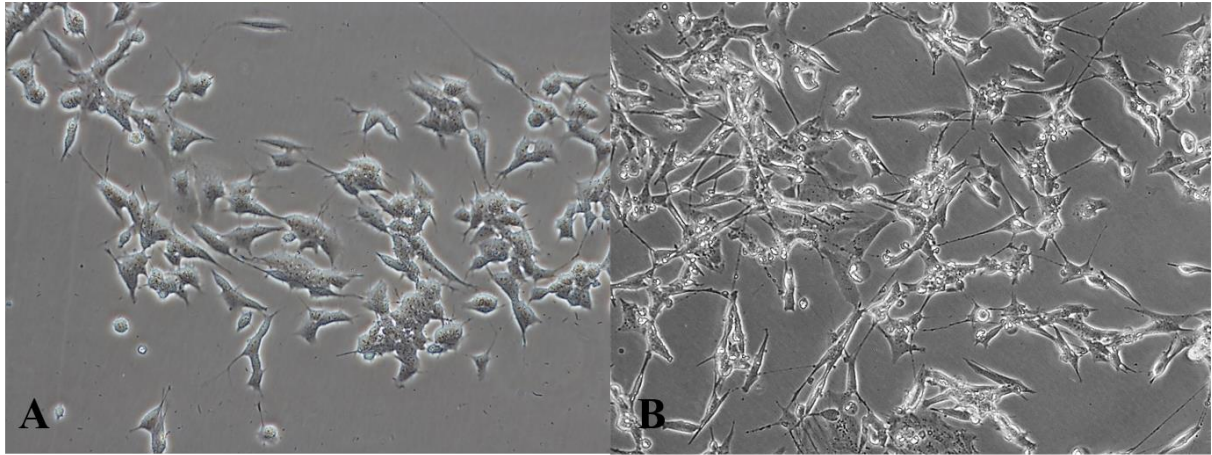


Figura 3. Células SH-SY5Y proliferativas (indiferenciadas) (A) e diferenciação celular confirmada pela presença de neuritos emitidos pelas células após 7 dias de diferenciação (B), nos quais as células SH-SY5Y foram tratadas com $10 \mu\text{M}$ de ácido retinoico (AR) e meio enriquecido com 1% de soro fetal bovino (SFB) (aumento de 20x).

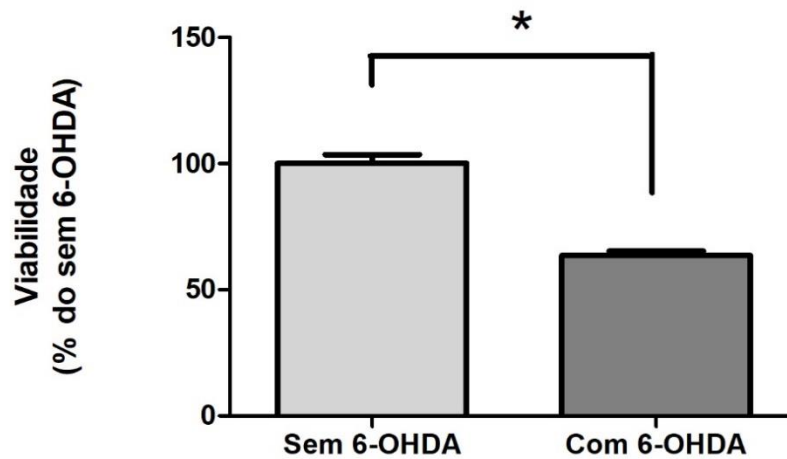


Figura 4. Avaliação da viabilidade celular em células SH-SY5Y diferenciadas tratadas com 6-OHDA na concentração de $15 \mu\text{M}$, independentemente da estimulação magnética estática (EME), mostrando diminuição na viabilidade celular das células tratadas com 6-OHDA ($p=0,00$). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$

MORFOLOGIA CELULAR

Em análise de dia 9, pode-se observar a diferença de morfologia entre os grupos (Figura 5). Os grupos que não foram expostos à 6-OHDA apresentaram células com a morfologia similar a neurônios, com a presença visível de neuritos. Já nos grupos expostos à toxina, foi observada uma diminuição no número de células, principalmente no grupo EME + OHDA, e presença reduzida de neuritos.

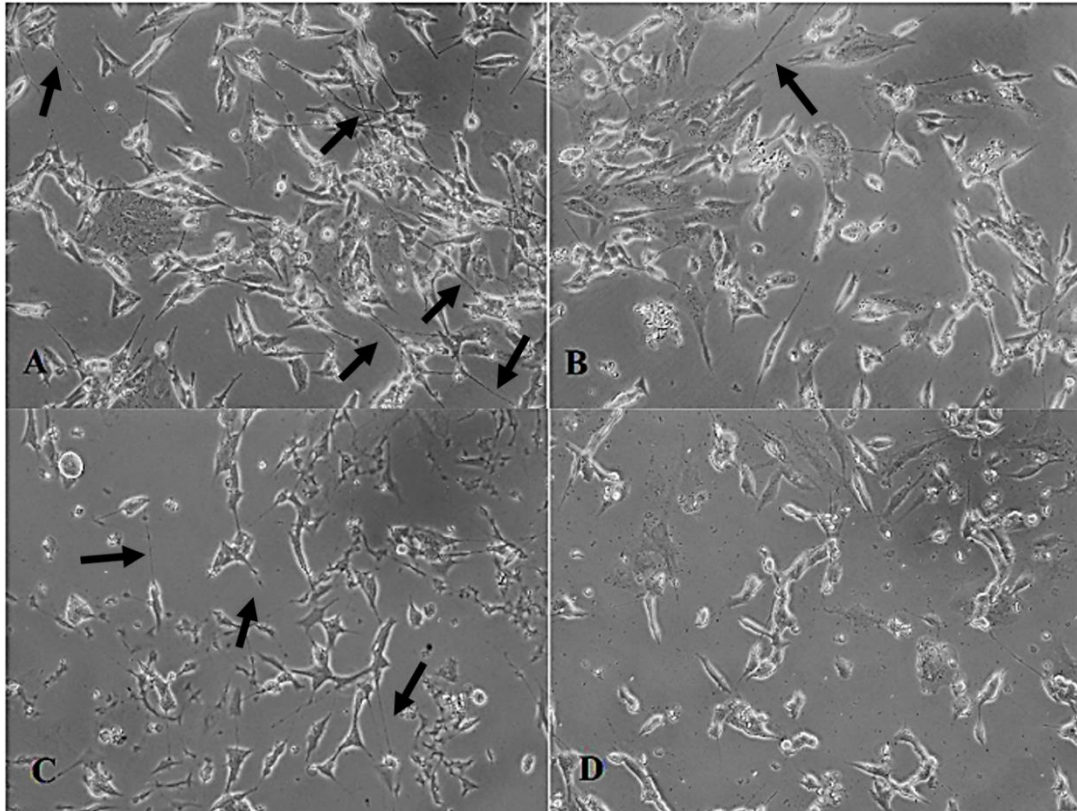


Figura 5. Morfologia das células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinoico (AR) em análise de dia 9 para os respectivos grupos de tratamento. É possível visualizar a diferença no número de células e a presença de neuritos entre os grupos (flechas). Foi possível observar a diminuição no número de células e a redução na abundância de neuritos nos grupos tratados com 6-OHDA (B e D), sendo estas diferenças mais pronunciadas no grupo exposto por 24h à EME e posteriormente à 6-OHDA (D). Em A, grupo controle; B, grupo 6-OHDA; C grupo EME e D grupo EME+6-OHDA (aumento de 20x).

VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE MTT

Avaliando-se os diferentes grupos, observamos diminuição da viabilidade celular nos grupos expostos a 15 μ M de 6-OHDA por 24h. O grupo tratado com 6-OHDA, apresentou redução na viabilidade ($67 \pm 6,2\%$) quando comparado com o controle ($100 \pm 4\%$) apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa. O mesmo se observa nos grupos expostos à EME, em que o grupo tratado com 6-OHDA, apresentou viabilidade de $65,2 \pm 4\%$,

numericamente menor em relação ao grupo exposto somente à EME ($108 \pm 11,2\%$) (Figura 6).

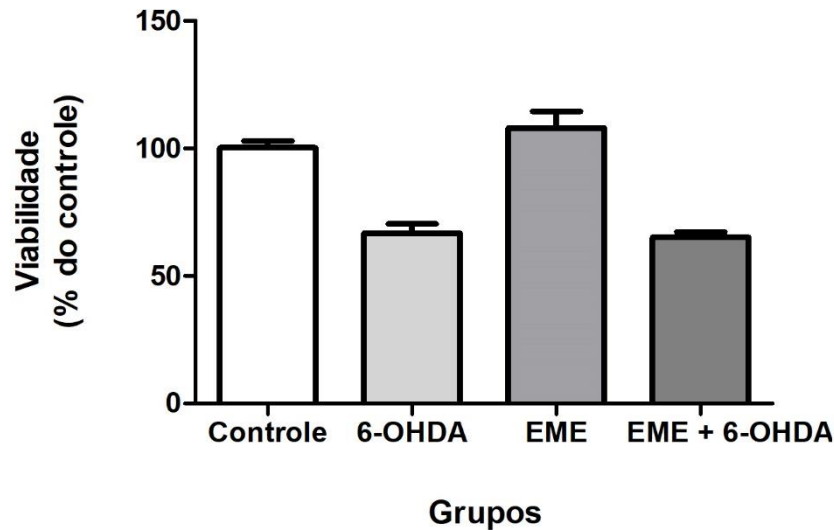


Figura 6. Resultado do ensaio de MTT nas células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinoico (AR) e seus respectivos grupos de tratamento. Diferenças na viabilidade celular em relação ao controle podem ser observadas nos grupos tratados com $15\mu\text{M}$ de 6-OHDA por 24h, porém sem diferença estatisticamente significativa. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão em relação ao % do controle.

AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR

A avaliação da morte celular foi realizada através da coloração com PI e HO. Núcleos de células consideradas viáveis, corados com HO, e núcleos de células consideradas mortas, corados com PI, estão demonstrados na figura 7A. Em 7B, observamos um aumento estatisticamente significativo ($p=0,023$) na morte celular do grupo exposto por 24h à EME e posteriormente à 6-OHDA ($104,8 \pm 18,5\%$) em comparação com o grupo que foi exposto somente à 6-OHDA ($70,15 \pm 18,5\%$), ilustrando o aumento na morte celular no grupo em que o protocolo de EME foi realizado. Para os grupos controle e EME os valores em % de morte celular foram de $32,2 \pm 10,1\%$ e $23,46 \pm 7\%$, respectivamente.

DENSIDADE DE NEURITOS

No que diz respeito à densidade de neuritos, os resultados foram similares entre os diferentes grupos de tratamento. O que se pode observar na figura 8 é um valor ligeiramente maior ($64,6 \pm 23,01$ A.U.) no grupo controle, que não foi exposto à EME nem à 6-OHDA, mas

sem diferença estatística. Para os demais grupos: 6-OHDA ($42,78 \pm 2,38$ A.U.); EME ($44,91 \pm 11,86$ A.U.) e EME + 6-OHDA ($46,76 \pm 20,05$ A.U.).

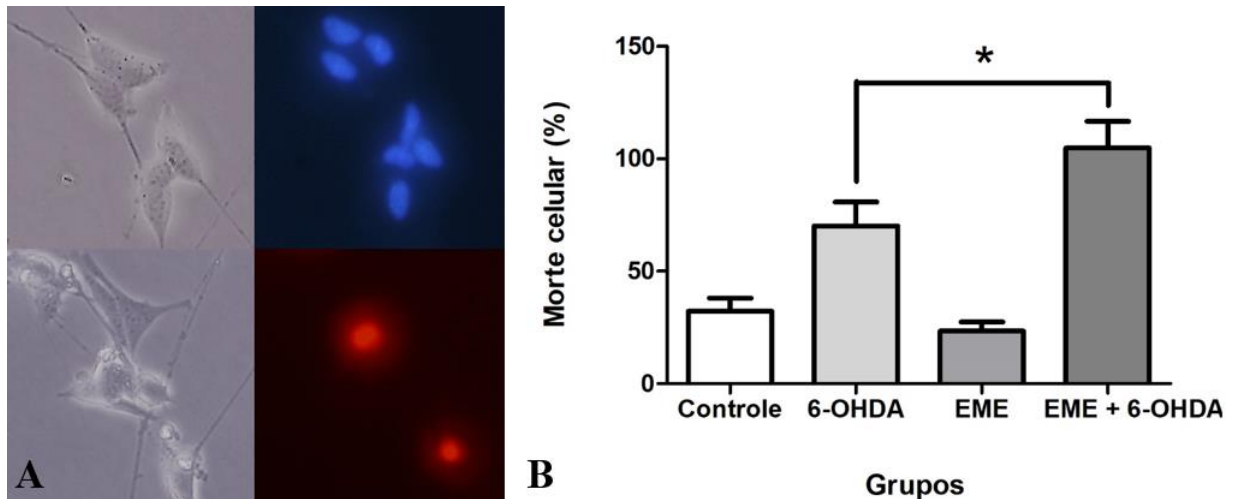


Figura 7. Análise de morte celular pela coloração de iodeto de propídeo (PI) e Hoescht_33342 (HO) nos diferentes grupos, em que se observa um aumento significativo na porcentagem (%) de morte celular no grupo exposto por 24h à estimulação magnética estática (EME) anteriormente à 6-OHDA, quando comparado com o grupo que não sofreu o protocolo de EME ($p=0,023$). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p<0,05$ (B). A morfologia e a coloração considerados para a contagem dos núcleos podem ser observados em A, em que núcleos de células viáveis foram corados em azul com HO e os núcleos de células mortas foram corados em vermelho com PI (aumento de 20x).

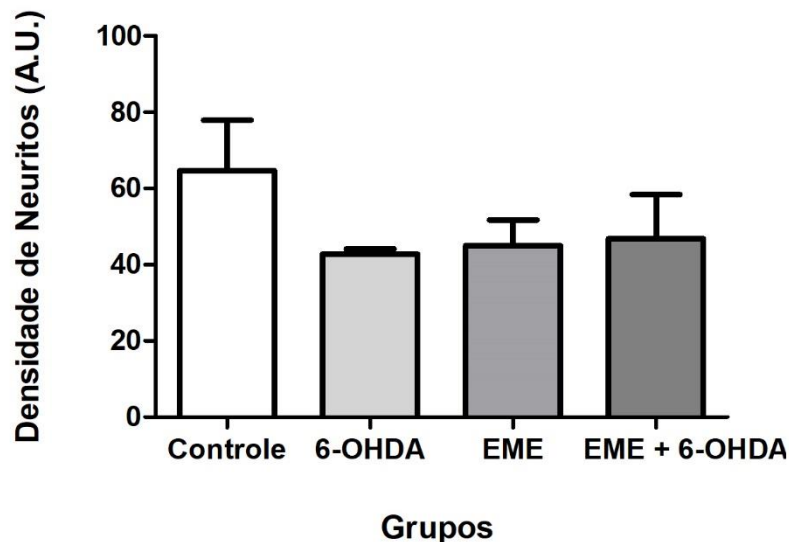


Figura 8. Valores de densidade de neuritos para os diferentes grupos, calculados a partir da divisão do comprimento dos neuritos pelo número de núcleos corados com Hoescht_33342 através do *plugin* "Neurongrowth" do *ImageJ*. Resultados similares foram obtidos entre os diferentes grupos de tratamento, apesar de um valor ligeiramente maior ser observado no grupo controle em comparação aos demais. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

DISCUSSÃO

Mimetizar características neuronais em modelos *in vitro* tem sido um tópico relevante em estudos de neurociência, principalmente pelo seu papel fundamental no estudo de doenças neurodegenerativas como a DP. Grande parte dos modelos utilizados para este fim envolvem células SH-SY5Y, que são amplamente utilizadas em pesquisa científica por serem fáceis de se cultivar e manipular, além de se mostrarem uma alternativa ao uso de modelos animais [16,17]. A morfologia neuronal, a diminuição da taxa de proliferação e o aumento na expressão de marcadores dopaminérgicos como o DAT podem ser alcançados através da diferenciação destas células com AR, como descrito neste e em outros trabalhos [12,14]. Neste âmbito, a 6-OHDA é a substância neurotóxica mais utilizada para mimetizar a DP em células SH-SY5Y, diferenciadas ou não com AR [14].

A diminuição na viabilidade de células SH-SY5Y tratadas com 6-OHDA é amplamente descrita na literatura. A entrada desta toxina nas células através do DAT, seu acúmulo e auto oxidação causam danos celulares. A formação de espécies reativas de oxigênio e a inibição de complexos mitocondriais responsáveis pela síntese de ATP parecem ser responsáveis pela morte celular, além da ativação de vias apoptóticas intracelulares [9]. Através do ensaio de MTT, nós observamos uma diminuição na viabilidade dos grupos que foram expostas à 6-OHDA, ainda que esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Porém, não houve mudança na viabilidade do grupo exposto previamente à EME como forma de proteção. Outros estudos que utilizaram modelos neuroprotetores em células SH-SY5Y expostas à 6-OHDA mostraram resultados positivos quanto à proteção exercida por certas substâncias, levando a um aumento na viabilidade celular, em contraste com o que nossos resultados mostram. Algas marinhas, descritas como antioxidantes e inibidoras de morte neuronal, tiveram sucesso na neuroproteção de um modelo semelhante ao utilizado no presente estudo [9], e resultado similar foi encontrado em estudo que avaliou a ação protetora de um extrato da fruta, *Garcinia mangostana*, rica em compostos antioxidantes, cultivada e consumida em abundância em países asiáticos [18].

Quando avaliamos a morte celular através da coloração de PI e HO nos diferentes grupos, encontramos um aumento significativo de morte no grupo que foi exposto à EME anteriormente ao dano com 6-OHDA, em comparação com o grupo que não passou pelo protocolo de EME. Este resultado sugere que, possivelmente, a EME tornou as células mais sensíveis à 6-OHDA. Um estudo que avaliou os efeitos do campo magnético estático de intensidade 0,5 T em células renais e astrócitos corticais reportou aumento gradual de células com morfologia necrótica, quando comparado com o grupo controle [19].

A avaliação da morfologia e as mudanças decorrentes da diferenciação são importantes para a validação do modelo de células SH-SY5Y diferenciadas com AR. A morfologia neuronal é visualizada através da presença de neuritos, que é o termo utilizado para designar axônios e dendritos emitidos por células em cultura, mas que não são axônios ou dendritos definitivos, como aqueles presentes em neurônios propriamente ditos. Métodos que avaliam o crescimento destes neuritos podem ser utilizados para avaliar os efeitos de substâncias químicas e tratamentos aos quais estas células são expostas, e isto pode ser realizado através de softwares de forma simples e barata [20]. Neste trabalho, os resultados obtidos demonstram a presença dos neuritos, que foram visualizados por microscopia em análise de dia 9, e a sua quantificação, nos diferentes grupos, foi diminuída nos grupos expostos à 6-OHDA, apesar desta diferença não ter apresentado significância estatística. Outro estudo que avaliou o efeito de compostos orgânicos antioxidantes em modelo de células SH-SY5Y diferenciado com AR mostrou diminuição na quantidade de neuritos em comparação com o controle [21].

Os resultados similares encontrados para a densidade de neuritos entre os diferentes grupos pode ser reflexo da semiautomação do processo que utiliza o *software ImageJ*, já que a medida do comprimento dos neuritos e a contagem de núcleos marcados com HO depende do julgamento do pesquisador que realiza tais contagens, principalmente no que deve ser considerado ou não um neurito. Portanto, é importante que ferramentas automatizadas sejam desenvolvidas a fim de que esse viés possa ser evitado, com o intuito de garantir maior acurácia nos dados obtidos através deste tipo de metodologia.

A técnica de EME utilizada no presente estudo, de intensidade 0,3 T por um período de 24h, parece ser capaz de modular as células do modelo em questão. Os parâmetros intensidade e tempo são, portanto, de extrema importância e podem ser modificados a fim de entendermos de que maneira a técnica poderia exercer seu efeito neuroprotetor. É importante notar que, na clínica, a técnica de EMTe aplicada em pacientes com DP utiliza protocolos com duração de 10 a 30 minutos de estimulação do córtex cerebral, sendo estes tempos muito menores quando comparados com as 24 ou 48 horas de estimulação comumente realizadas *in vitro* [8,22–24]. Estas diferenças refletem a necessidade de se avaliar os efeitos da EME em modelos celulares durante tempos menores, possibilitando uma comparação da técnica utilizada *in vitro* com os estudos *in vivo*.

Além disso, o número de aplicações da técnica também pode refletir no desfecho buscado. Oito sessões de Estimulação Magnética Transcraniana repetitiva (EMTr) a uma intensidade de 25 Hz durante um período de quatro semanas mostraram resultados positivos em

pacientes com DP, que apresentaram melhora no caminhar e no movimento das mãos por um período que se estendeu por um mês [25].

Ademais, este estudo fez uso da técnica de Estimulação Magnética Estática em um modelo celular da doença de Parkinson de forma pioneira, e a investigação da neuroproteção deste tratamento no modelo é inédita na literatura. A avaliação dos efeitos do campo magnético estático em diferentes intensidades, tempos e momentos auxiliará no entendimento de seus efeitos e na sua possível ação como técnica protetora.

CONCLUSÃO

Os presentes resultados mostram que as condições de tratamento utilizadas com a EME aplicada no modelo celular *in vitro* da DP não mostraram efeitos neuroprotetores como hipotetizados inicialmente, tendo, pelo contrário, aumentado a morte celular no modelo de estudo. Estes resultados sinalizam a importância de novos estudos utilizando campos magnéticos estáticos sobre modelos celulares, com diferentes condições, bem como uma melhor avaliação de seu mecanismo de ação sobre as células estudadas. Ainda, a avaliação da morte celular através de ensaios de apoptose, produção de espécies reativas de oxigênio e avaliação da integridade mitocondrial são questões importantes a serem definidas em estudos futuros.

FINANCIAMENTO

FIPE-HCPA, CNPq e CAPES.

CONFLITOS DE INTERESSE

Nenhum.

REFERÊNCIAS

- [1] L. V. Kalia, A.E. Lang, Parkinson's disease, *Lancet*. 386 (2015) 896–912. doi:10.1016/S0140-6736(14)61393-3.
- [2] S. Lesage, A. Brice, Parkinson's disease: From monogenic forms to genetic susceptibility factors, *Hum. Mol. Genet.* 18 (2009) 48–59. doi:10.1093/hmg/ddp012.
- [3] D. Blum, S. Torch, N. Lambeng, M.F. Nissou, A.L. Benabid, R. Sadoul, J.M. Verna, Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: Contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease, *Prog. Neurobiol.* 65 (2001) 135–172. doi:10.1016/S0301-0082(01)00003-X.

- [4] H. Morrin, T. Fang, D. Servant, D. Aarsland, A.P. Rajkumar, Systematic review of the efficacy of non-pharmacological interventions in people with Lewy body dementia, *Int. Psychogeriatrics*. (2017) 1–13. doi:10.1017/S1041610217002010.
- [5] F. Fregni, A. Pascual-Leone, Technology Insight: Noninvasive brain stimulation in neurology - Perspectives on the therapeutic potential of rTMS and tDCS, *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 3 (2007) 383–393. doi:10.1038/ncpneuro0530.
- [6] A. Oliviero, L. Mordillo-Mateos, P. Arias, I. Panyavin, G. Foffani, J. Aguilar, Transcranial static magnetic field stimulation of the human motor cortex, *J. Physiol.* 589 (2011) 4949–4958. doi:10.1113/jphysiol.2011.211953.
- [7] M.Á. Trillo, M.A. Martínez, M.A. Cid, A. Úbeda, Retinoic acid inhibits the cytoproliferative response to weak 50-Hz magnetic fields in neuroblastoma cells, *Oncol. Rep.* 29 (2013) 885–894. doi:10.3892/or.2012.2212.
- [8] L. Zhang, X. Ji, X. Yang, X. Zhang, Cell type- and density-dependent effect of 1 T static magnetic field on cell proliferation, *Oncotarget.* 8 (2017) 13126–13141. doi:10.18632/oncotarget.14480.
- [9] J. Silva, C. Alves, S. Pinteus, S. Mendes, R. Pedrosa, Neuroprotective effects of seaweeds against 6-hydroxidopamine-induced cell death on an in vitro human neuroblastoma model, *BMC Complement. Altern. Med.* 18 (2018) 4–13. doi:10.1186/s12906-018-2103-2.
- [10] F.M. Lopes, I.J. Bristot, L.L. da Motta, R.B. Parsons, F. Klamt, Mimicking Parkinson's Disease in a Dish: Merits and Pitfalls of the Most Commonly used Dopaminergic In Vitro Models, *NeuroMolecular Med.* 19 (2017) 241–255. doi:10.1007/s12017-017-8454-x.
- [11] P. Schönhofen, L.M. de Medeiros, I.J. Bristot, F.M. Lopes, M.A. De Bastiani, F. Kapczinski, J.A.S. Crippa, M.A.A. Castro, R.B. Parsons, F. Klamt, Cannabidiol Exposure During Neuronal Differentiation Sensitizes Cells Against Redox-Active Neurotoxins, *Mol. Neurobiol.* 52 (2015) 26–37. doi:10.1007/s12035-014-8843-1.
- [12] F.M. Lopes, L.L. da Motta, M.A. De Bastiani, B. Pfaffenseller, B.W. Aguiar, L.F. de Souza, G. Zanatta, D.M. Vargas, P. Schönhofen, G.F. Londero, L.M. de Medeiros, V.N. Freire, A.L. Dafre, M.A.A. Castro, R.B. Parsons, F. Klamt, RA Differentiation Enhances Dopaminergic Features, Changes Redox Parameters, and Increases Dopamine Transporter Dependency in 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells, *Neurotox. Res.* 31 (2017) 545–559. doi:10.1007/s12640-016-9699-0.
- [13] H.R. Medeiros, Avaliação da estimulação magnética estática em linhagem celular de

neuroblastoma e neuroblastoma diferenciado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

- [14] F.M. Lopes, R. Schröder, M.L.C. da F. Júnior, A. Zanotto-Filho, C.B. Müller, A.S. Pires, R.T. Meurer, G.D. Colpo, D.P. Gelain, F. Kapczinski, J.C.F. Moreira, M. da C. Fernandes, F. Klamt, Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies, *Brain Res.* 1337 (2010) 85–94. doi:10.1016/j.brainres.2010.03.102.
- [15] Z. Fanti, M. Elena Martinez-Perez, F.F. de-Miguel, Neurongrowth, a software for automatic quantification of neurite and filopodial dynamics from time-lapse sequences of digital images, *Dev. Neurobiol.* (2011). doi:10.1002/dneu.20866.
- [16] H. Xie, L. Hu, G. Li, SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, *Chin. Med. J. (Engl.)*. (2010). doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2010.08.021.
- [17] J. Kovalevich, D. Langford, Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology., *Methods Mol. Biol.* (2013). doi:10.1007/978-1-62703-640-5_2.
- [18] Y. Jaisin, P. Ratanachamnong, C. Kuanpradit, W. Khumpum, S. Suksamrarn, Protective effects of γ -mangostin on 6-OHDA-induced toxicity in SH-SY5Y cells, *Neurosci. Lett.* 665 (2018) 229–235. doi:10.1016/j.neulet.2017.11.059.
- [19] C.F. Buemi M1, Marino D, Di Pasquale G, Floccari F, Senatore M, Aloisi C, Grasso F, Mondio G, Perillo P, Frisina N, Cell proliferation/cell death balance in renal cell cultures after exposure to a static magnetic field, *Nephron.* 87 (2001) 269–273. doi:10.1159/000045925.
- [20] N.M. Radio, W.R. Mundy, Developmental neurotoxicity testing in vitro: Models for assessing chemical effects on neurite outgrowth, *Neurotoxicology.* 29 (2008) 361–376. doi:10.1016/j.neuro.2008.02.011.
- [21] F.M. Lopes, G.F. Londero, L.M. De Medeiros, L.L. Da Motta, G.A. Behr, V.A. De Oliveira, M. Ibrahim, J.C.F. Moreira, L. De Oliveira Porciúncula, J.B.T. Da Rocha, F. Klamt, Evaluation of the neurotoxic/neuroprotective role of organoselenides using differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cell line challenged with 6-hydroxydopamine, *Neurotox. Res.* 22 (2012) 138–149. doi:10.1007/s12640-012-9311-1.
- [22] M. Dileone, M.C. Carrasco-López, J.C. Segundo-Rodríguez, L. Mordillo-Mateos, N. López-Ariztegui, F. Alonso-Frech, M.J. Catalan-Alonso, J.A. Obeso, A. Oliviero, G. Foffani, Dopamine-dependent changes of cortical excitability induced by transcranial

static magnetic field stimulation in Parkinson's disease, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–7.
doi:10.1038/s41598-017-04254-y.

- [23] M. Dileone, L. Mordillo-Mateos, A. Oliviero, G. Foffani, Long-lasting effects of transcranial static magnetic field stimulation on motor cortex excitability, *Brain Stimul.* 11 (2018) 676–688. doi:10.1016/j.brs.2018.02.005.
- [24] C. Vergallo, M. Ahmadi, H. Mobasheri, L. Dini, Impact of inhomogeneous static magnetic field (31.7-232.0 mT) exposure on human neuroblastoma SH-SY5Y cells during cisplatin administration, *PLoS One.* 9 (2014) 1–19.
doi:10.1371/journal.pone.0113530.
- [25] P.C. Miranda, M. Lomarev, M. Hallett, Modeling the current distribution during transcranial direct current stimulation, *Clin. Neurophysiol.* (2006).
doi:10.1016/j.clinph.2006.04.009.

HIGHLIGHTS

1. 6-Hidroxidopamina altera viabilidade e morfologia das células SH-SY5Y diferenciadas;
2. Estimulação magnética estática parece sensibilizar células expostas à 6-hidroxidopamina;
3. Estimulação magnética estática prévia aumenta morte celular em modelo de Parkinson.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente trabalho obteve êxito no que diz respeito à diferenciação das células SH-SY5Y, no qual os cuidados com a troca de meio e a adição da quantidade correta de ácido retinoico, segundo o protocolo, foram de extrema importância.

Além disso, o modelo da doença de Parkinson foi mimetizado *in vitro* com sucesso, através da administração de 6-OHDA, previamente diluída em ácido ascórbico, evitando-se assim sua oxidação e o possível fracasso do modelo.

O aumento da morte celular observada no grupo tratado com 6-OHDA e que foi previamente exposto à EME precisa ser melhor investigado a fim de que se entenda de que forma a exposição do modelo a campos magnéticos estáticos influencia na sua sensibilidade ao tratamento com 6-OHDA.

É importante salientar, também, que para todos os experimentos realizados há necessidade de aumento do número amostral, buscando diminuir a variabilidade nos resultados encontrados e obter diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados. Assim, os dados obtidos serão mais robustos e poderão ser melhor discutidos, além de tornar possível a realização de inferências mais concretas.

Ademais, este estudo lançou mão da utilização de Estimulação Magnética Estática em um modelo *in vitro* da doença de Parkinson de forma pioneira, pois não há descrição de tal tipo de estudo na literatura até o momento. Ainda, a utilização de um tratamento que visa avaliar neuroproteção traz luz para os caminhos daqueles que buscam alternativas terapêuticas não-farmacológicas e não-invasivas, mais confortáveis e seguras para os pacientes, ainda que até o presente sigam somente nas linhas de pesquisa básica.

Como perspectivas, iremos aumentar o número amostral e avaliar os efeitos do campo magnético estático com diferentes intensidades, em diferentes momentos e por tempos menores, a fim de entendermos melhor os efeitos e mecanismos de ação da EME no modelo celular *in vitro* da doença de Parkinson. Também consideramos importante avaliar a morte celular através de ensaios de apoptose e utilizar respirometria de alta resolução a fim de avaliar os efeitos do campo magnético na mitocôndria, uma das organelas que desempenham papel fundamental na fisiopatologia da doença de Parkinson.

REFERÊNCIAS

- BARKER, A. T.; JALINOUS, R.; FREESTON, I. L. Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. **The Lancet**, v. 325, n. 8437, p. 1106-1107. 1985.
- CORTI, Olga et al. Parkinson's disease: From causes to mechanisms. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 328, n. 2, p. 131-142, 2005.
- DAUER, William; PRZEDBORSKI, Serge. Parkinson's disease: Mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889-909, 2003.
- DESIDÉRIO, David Lucas. **Efeito de campos magnéticos estáticos e compensados na proliferação celular in vitro**. 2017. 109f. Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas Aplicadas: Biologia Oral) - Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, Bauru, 2017.
- FORTE, Yago. **Estimulação magnética transcraniana**. 2015. Disponível em: <<http://ch.jogoeiprarolo.com/2015/12/25/estimulacao-magnetica-transcraniana>>. Acesso em: 21 abr. 2018.
- FREGNI, Felipe; PASCUAL-LEONE, Alvaro. Technology Insight: Noninvasive brain stimulation in neurology - Perspectives on the therapeutic potential of rTMS and tDCS. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 3, n. 7, p. 383-393, 2007.
- MEDEIROS, Helouise Richardt. **Avaliação da estimulação magnética estática em linhagem celular de neuroblastoma e neuroblastoma diferenciado**. 2017. 60f. Dissertação (Mestrado em Medicina: Ciências Médicas)- Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.
- KALIA, Lorraine V.; LANG, Anthony E. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 386, n. 9996, p. 896-912, 2015.
- KIM, Seung Chan et al. Static magnetic field controls cell cycle in cultured human glioblastoma cells. **Cytotechnology**, v. 68, n. 6, p. 2745-2751, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10616-016-9973-2>> Acesso em: 21 abr. 2018.
- LESAGE, Suzanne; BRICE, Alexis. Parkinson's disease: From monogenic forms to genetic susceptibility factors. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. R1, p. 48-59, 2009.
- LIANG, Zhigang et al. Neuroprotective effects of tenuigenin in a SH-SY5Y cell model with 6-OHDA-induced injury. **Neuroscience Letters**, v. 497, n. 2, p. 104-109, 2011.
- 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**, v. 1337, p. 85-94, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.102>> Acesso em: 22 abr. 2018.
- LOPES, Fernanda Martins et al. Mimicking Parkinson's Disease in a Dish: Merits and Pitfalls of the Most Commonly used Dopaminergic In Vitro Models. **NeuroMolecular Medicine**, v.

19, n. 2-3, p. 241-255, 2017.

MORRIN, Hamilton et al. Systematic review of the efficacy of non-pharmacological interventions in people with Lewy body dementia. **International Psychogeriatrics**, p. 1–13, 2017. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1041610217002010/type/journal_article>. Acesso em: 22 abr. 2018.

MULLIN, Stephen; SCHAPIRA, Anthony H. V. Pathogenic Mechanisms of Neurodegeneration in Parkinson Disease. **Neurologic Clinics**, v. 33, n. 1, p. 1–17, 2015.

NOOHI, Sima; AMIRSALARI, Susan. History, studies and specific uses of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in treating epilepsy. **Iranian Journal of Child Neurology**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2016.

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

PIVETTA, Marcos. A fraqueza das células-tronco. **Pesquisa FAPESP**, n. 183, maio 2011.

ROSSI, Simone et al. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. **Clinical Neurophysiology International Federation of Clinical Neurophysiology**, v. 120, n. 12, p. 2008-2039, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2009.08.016>> Acesso em: 21 abr. 2018.

SCHÖNHOFEN, Patrícia et al. Cannabidiol Exposure During Neuronal Differentiation Sensitizes Cells Against Redox-Active Neurotoxins. **Molecular Neurobiology**, v. 52, n. 1, p. 26–37, 2015.

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

VONLOH, Matthew; CHEN, Robert; KLUGER, Benzi. Safety of transcranial magnetic stimulation in Parkinson ' s disease : A review of the literature. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 19, n. 6, p. 573–585, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2013.01.007>> Acesso em 15 abr. 2018.

WEI, Lei et al. Wnt3a protects SH-SY5Y cells against 6-hydroxydopamine toxicity by restoration of mitochondria function. **Translational Neurodegeneration**, v. 4, n. 1, p. 4–11, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40035-015-0033-1>> Acesso em 22 abr. 2018.

ZANGEN, Abraham et al. Transcranial magnetic stimulation of deep brain regions: Evidence for efficacy of the H-Coil. **Clinical Neurophysiology**, v. 116, n. 4, p. 775–779, 2005.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA *NEUROSCIENCE LETTERS*



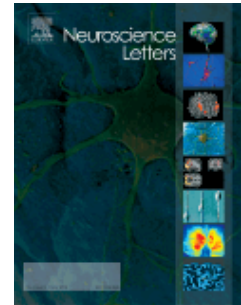
NEUROSCIENCE LETTERS

The rapid communication journal for the neurosciences.

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

| | |
|---------------------------------|------------|
| Description | p.1 |
| Audience | p.1 |
| Impact Factor | p.1 |
| Abstracting and Indexing | p.1 |
| Editorial Board | p.2 |
| Guide for Authors | p.3 |



ISSN: 0304-3940

DESCRIPTION

Neuroscience Letters is devoted to the rapid publication of short, high-quality papers of interest to the broad community of neuroscientists. Papers in all areas of neuroscience - molecular, cellular, developmental, systems, behavioral, cognitive, and computational - will be considered for publication. Submission of laboratory investigations that shed light on disease mechanisms is encouraged. Clinical studies will only be considered when they provide new information about the organization or actions of the nervous system, or provide new insights into the neurobiology of disease.

Neuroscience Letters does not publish case reports; papers that are primarily devoted to psychological or philosophical questions, papers that use unvalidated methodology, or that fall outside of the realm of neuroscience will also not be published.

AUDIENCE

Neuroscientists, neurologists

IMPACT FACTOR

2016: 2.180 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2017

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
 Chemical Abstracts
 Current Contents/Life Sciences
 EMBASE
 MEDLINE®
 Pascal M
 Reference Update
 Science Citation Index
 Elsevier BIOBASE
 Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

S.G. Waxman, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA

Deputy Editors:

Ausim Azizi, Temple University Hospital, Philadelphia, Pennsylvania, USA

Pamela Knapp, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, USA

Associate Editors:

J. Black, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA

C. Bolanos, Texas A&M University, College Station, Texas, USA

T. Bonhoeffer, Max Planck Institut (MPI) für Neurobiologie, Martinsried, Germany

G. Bottini, Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italy

W.B.J. Cafferty, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA

T. Cummins, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, USA

C. Dalton, Sheffield Hallam University, Sheffield, UK

R.D. Fields, Bethesda, MD, USA

K. Friston, University College London (UCL), London, UK

A. Fuglevand, University of Arizona, Tucson, Arizona, USA

F.H. Gage, The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, California, USA

P. Geha, Yale University, New Haven, Connecticut, USA

S. Grillner, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

C. Gross, Princeton University, Princeton, New Jersey, USA

A.J. Hannan, University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia

J. Hardy, University College London (UCL), London, UK

M. Harte, University of Manchester, Manchester, UK

Y. Iyata, Kyoto Prefectural Government, Kyoto, Japan

M. Kitazawa, University of California at Merced, Merced, California, USA

J.D. Kocsis, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA

O. Lazarov, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois, USA

W. Lin, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA

Z. Liu, Chinese Academy of Sciences, Institute of Neuroscience, Shanghai, China

D.C Lyon, University of California at Irvine, CA 92697-1275, USA

E. Macaluso, Santa Lucia Foundation, Rome, Italy

P. Magistretti, Université de Lausanne, Lausanne, Switzerland

R.C. Malenka, Stanford University School of Medicine, Palo Alto, California, USA

M. Manchia, Università di Cagliari, Sardinia, Italy

D. Matuskey, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA

P. McHugh, Centre for Biomarker Research, Huddersfield, UK

A. Nishiyama, University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA

H.B. Nygaard, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada

J.M. Pascual, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA

C. Pittenger, Yale University, New Haven, Connecticut, USA

K. Sathian, Penn State University, Hershey, USA

J. Savitz, University of Tulsa, Tulsa, Oklahoma, USA

P. Schweinhardt, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

D.W. Self, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA

Y. Shen, University of Science and Technology of China (USTC), Hefei, China

W. Singer, Max Planck Institute (MPI) for Brain Research, Frankfurt, Germany

J. Syka, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

E. Sykova, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

E. Tunbridge, Warneford Hospital, Headington, Oxford, UK

J. Veliskova, New York Medical College, Valhalla, New York, USA

Z. Wang, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China

D.R. Weinberger, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA

J. Wood, University College London (UCL), London, UK

H. Yu, Fudan University, Shanghai, China

C.-L. Zhang, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA

J. Zhao, University College London (UCL), London, UK

H.Y. Zoghbi, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Neuroscience Letters is devoted to the rapid publication of short, high-quality papers of interest to the broad community of neuroscientists. Only papers which will make a significant addition to the literature in the field will be published. Papers in all areas of neuroscience - molecular, cellular, developmental, systems, behavioral and cognitive, as well as computational - will be considered for publication. Submission of laboratory investigations that shed light on disease mechanisms is encouraged. Clinical studies will also be published if they provide new information about organization or actions of the nervous system, or provide new insights into the neurobiology of disease. NSL does not publish case reports.

Papers that are primarily devoted to psychological or philosophical questions, that use unvalidated methodology, or that fall outside of the realm of neuroscience, will not be published.

The Neuroscience Peer Review Consortium

Neuroscience Letters is a member of the Neuroscience Peer Review Consortium (NPRC). The NPRC has been formed to reduce the time expended and, in particular, the duplication of effort by, and associated burden on reviewers involved in the peer review of original neuroscience research papers. It is an alliance of neuroscience journals that have agreed to accept manuscript reviews from other Consortium journals. By reducing the number of times that a manuscript is reviewed, the Consortium will reduce the load on reviewers and Editors, and speed the publication of research results.

If a manuscript has been rejected by another journal in the Consortium, authors can submit the manuscript to *Neuroscience Letters* and indicate that the referees' reports from the first journal will be made available to the Editors of *Neuroscience Letters*.

It is the authors' decision as to whether or not to indicate that a set of referee's reports should be forwarded from the first journal to *Neuroscience Letters*. If an author does not wish for this to happen, the manuscript can be submitted to *Neuroscience Letters* without reference to the previous submission. No information will be exchanged between journals except at the request of authors. However, if the original referees' reports suggested that the paper is of high quality, but not suitable for the first journal, then it will often be to an author's advantage to indicate that referees' reports should be made available.

Authors should revise the original submission in accordance with the first journal's set of referee reports, reformat the paper to *Neuroscience Letters*' specification and submit the paper to *Neuroscience Letters* with a covering letter describing the changes that have been made, and informing the Editors that the authors will ask for the referees' reports to be forwarded from the first Consortium journal. The authors then must contact the first journal, and ask that reviews be forwarded, indicating they have submitted to *Neuroscience Letters*, and providing the new manuscript ID number.

The Editors of *Neuroscience Letters* will use forwarded referees' reports at their discretion. The Editors may use the reports directly to make a decision, or they may request further reviews if they feel such are necessary.

Visit <http://nprc.incf.org> for a list of Consortium journals, as well as further information on the scheme.

Types of Article

Neuroscience Letters will publish only the following article type:

Research Article: A report of original research which assesses the contribution of the research outcomes to the body of knowledge in a given area.

Mini-Reviews: Reviews are typically invitation-only and are normally published in thematic special issues.

Length of manuscripts should be no more than 5000 words (approximately 6 printed pages). As an approximate guide to authors for judging the length of their paper, the following estimation may be used: heading + abstract = 0.5-0.6 pages; 3 type-written (double-spaced) pages = 1 printed page; (when using a word-processor) 850 words or 5300 characters = 1 printed page; 3 single-column wide or 2 double-column wide figures plus legends = 1 printed page; 3 single-column wide or 2 double-column wide tables = 1 printed page; 17 references = 0.5 printed page.

Authors of invited Special Issue review articles may exceed the 5000 word limit if required, although please check with the issues Guest Editor(s) prior to submission.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The*

Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans

<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EC Directive 86/609/EEC for animal experiments

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>.

This must be stated at an appropriate point in the article.

For other policy issues, authors are referred to the policy guidelines of the Society for Neuroscience (see their website <http://www.jneurosci.org/misc/itoa.shtml>).

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/ registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright- holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or

rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by

their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 2350**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of

the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/nsl/>

For submission queries, please contact the Editorial Office (NSL@elsevier.com).

Referees

Authors must send the names, addresses and email addresses for 8-10 potential referees that meet the following criteria: potential referees must be experts or active workers in the field, must not be current or prior mentors or collaborators, and must have institutional email addresses (e.g., xx.yy@zz.edu) and not generic email addresses (e.g., xx.yy@163.com or xx.yy@gmail.com). Although the journal does not guarantee these reviewers will be used, the Editors take these suggestions under consideration. These recommendations help the journal speed the editorial process.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply "the text".

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is in very occasional cases appropriate, although in general, Results and Discussion should be presented as distinct sections of the manuscript. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable

file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are

given here.*Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References*Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last

accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/neuroscience-letters>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese

oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are

sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer

questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).