

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

Débora Helena Zanini Gotardi

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA NA DIFERENCIAÇÃO,
VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS-
TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO DE SUÍNOS**

Porto Alegre

2018

Débora Helena Zanini Gotardi

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA NA DIFERENCIAÇÃO,
VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS-
TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO DE SUÍNOS**

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.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elizabeth Obino Cirne-Lima

Coorientadora: Dr.^a Paula Barros Terraciano

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Gotardi, Débora Helena Zanini

Efeito da estimulação magnética na diferenciação, viabilidade, proliferação e migração celular de células-tronco derivadas de tecido adiposo de suínos / Débora Helena Zanini Gotardi. -- 2018.

54 f.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elizabeth Obino Cirne-Lima.

Coorientadora: Dr.^a Paula Barros Terraciano.

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. Células-tronco. 2. Campo magnético estático. 3. Diferenciação celular. 4. Viabilidade celular. 5. Migração celular. I. Cirne-Lima, Prof.^a Dr.^a Elizabeth Obino, orient. II. Terraciano, Dr.^a Paula Barros, coorient. III. Título

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

Débora Helena Zanini Gotardi

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA NA DIFERENCIAÇÃO,
VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS-
TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSE DE SUÍNOS**

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

Dr.^a Fernanda dos Santos de Oliveira, HCPA

Dr. Eduardo Cremonese Filippi Chiela, HCPA

Prof.^a Dr.^a Elizabeth Obino Cirne-Lima, UFRGS - Orientadora

Aos meus pais,
pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Prof.^a Betty, pelo acompanhamento em cada etapa da realização deste trabalho, por acreditar que seria possível e pelo incentivo. Muito obrigada!

À minha coorientadora, Paula, por toda ajuda e por tudo que me ensinaste durante esses quatro anos. Muito obrigada pela confiança no meu trabalho e pelo incentivo de sempre. Que venham os artigos e os novos desafios!

À Cris Kuhl, pela grande ajuda na estatística do trabalho.

A todas as colegas do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, pela disponibilidade e parceria, especialmente à Raquel, Martina, Helouise e Nicole. Muito obrigada gurias, vocês foram essenciais nesse trabalho.

Aos amigos que a Biomedicina e o Laboratório me trouxeram, em especial ao Alexandre, por todas as indicações de filmes, todas as horas de estudo e todas as reclamações diárias; à Kamila, minha eterna companheira de laboratório; e à Thabata, por todas as conversas, por todo apoio e por toda a ajuda, em todos os momentos. Muito obrigada!

À Bruna, minha catarinense e confidente. Obrigada pela amizade, por todas as conversas e por todo o apoio que sempre me deu. Te amo.

À Juliana, por todos esses anos de amizade que a Biomedicina nos proporcionou. Pelo companheirismo e amizade nos melhores e, principalmente, nos piores momentos. Obrigada por tudo! Te amo.

Ao Lucas, pelo amor, companheirismo e ajuda durante esses meses. A tua ajuda e o teu apoio foram essenciais na conclusão dessa etapa. Te amo muito.

Aos meus irmãos, Eduardo e Leandro, por me ensinarem tantas coisas. Amo vocês.

E aos meus pais, Elda e Jaime, por tudo que me ensinaram, pela compreensão e pelo apoio incondicional. Tudo isso é por vocês e pra vocês! Meu amor e minha eterna gratidão a vocês.

Sem o apoio e a ajuda de cada um de vocês nada disso seria possível.

À vocês, minha eterna gratidão.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta”.

Carl Sagan

RESUMO

Devido ao potencial terapêutico e ao efeito imunomodulatório das células-tronco mesenquimais, as pesquisas com essas células vem tornando-se cada vez mais uma importante ferramenta no desenvolvimento de novos tratamentos para pacientes com lesões teciduais. A estimulação magnética estática é capaz de promover diversos efeitos à nível celular, como o aumento ou a diminuição da viabilidade e da proliferação celular, assim como também pode atuar na diferenciação *in vitro* de células-tronco. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do campo magnético de intensidade moderada (0,3T) na diferenciação celular *in vitro*, na viabilidade, na morfologia nuclear, na proliferação e na capacidade de migração de células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSC) de suínos. As células utilizadas nos experimentos foram descongeladas e expandidas até as passagens 4 e 5, e após atingirem confluência de 80-90% foram mantidas em placas de 24 poços na concentração 1×10^4 . Após a estimulação magnética por 24 horas, foi possível observar que as ADSC mantiveram sua capacidade de diferenciação em dois tipos celulares: adipócitos e osteoblastos. Observamos também um aumento na taxa de viabilidade celular das células expostas ao campo magnético ($p < 0,05$), comparadas com as células controle. A estimulação magnética não promoveu apoptose nas células em cultura. A taxa de proliferação celular foi semelhantes entre os grupos, mas a capacidade de migração celular foi maior nas culturas estimuladas ($p < 0,05$), podendo ser possível observar uma redução na área total da fenda confeccionada. Tendo em vista os resultados obtidos, é possível inferir que a exposição ao campo magnético de intensidade moderada (0,3T) pode vir a ser utilizada de forma benéfica na estimulação magnética de ADSC de suíno, influenciando positivamente importantes parâmetros envolvidos na atuação dessas células na regeneração de tecidos lesionados.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais. Campo magnético. Diferenciação celular. Viabilidade celular. Apoptose. Proliferação celular. Migração celular.

ABSTRACT

Due to the therapeutic potential and the immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells, the research in this field has become an important tool in the development of new treatments for patients with tissue lesions. Static magnetic stimuli can produce several effects at the cellular level, such as increasing or decreasing cell viability and proliferation, as well as promoting *in vitro* differentiation of stem cells. The aim of this study is to analyze the effect of a moderate-intensity magnetic field (0.3T) on *in vitro* cell differentiation, viability, nuclear morphology, proliferation and the cell migration capacity of porcine adipose-derived stem cells (ADSC). The cells used in the experiments were thawed and expanded to passages 4 and 5, and, after reaching 80-90% confluency, were plated in 24-well plates at 1×10^4 concentration. After the 24-hour magnetic stimulation, we observed that the ADSC maintained their differentiation capacity in the two cell types tested: adipocytes and osteoblasts. We also observed an increase in the cell viability rate of the cells exposed to the magnetic field ($p < 0.05$), when compared to the control cells. Magnetic stimulation did not promote apoptosis in the cultured cells. The cell proliferation rate was similar between the groups, but the cell migration capacity was higher in the stimulated cultures ($p < 0.05$), and we observed a more significant reduction in the total area of the slit. Considering the results obtained, it is possible to infer that exposure to a moderate-intensity magnetic field (0.3T) can be used in a beneficial way in the magnetic stimulation of porcine ADSC, thereby positively influencing the performance of these cells in the regeneration of injured tissues.

Keywords: Mesenchymal stem cells. Magnetic field. Cell differentiation. Cell viability. Apoptosis. Cell proliferation. Cell migration.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	CULTIVO CELULAR	10
1.2	CÉLULAS-TRONCO	11
1.3	CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	14
1.4	CAMPO MAGNÉTICO	15
1.5	CAMPO MAGNÉTICO <i>IN VIVO</i>	16
1.6	CAMPO MAGNÉTICO <i>IN VITRO</i>	17
2	JUSTIFICATIVA	19
3	OBJETIVOS	20
3.1	OBJETIVO GERAL.....	20
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4	ARTIGO CIENTÍFICO	21
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	36
	REFERÊNCIAS	37
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA “<i>IN VITRO CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY – ANIMAL</i>”	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 CULTIVO CELULAR

O cultivo celular é uma técnica desenvolvida para estudar o comportamento de células de um determinado tecido em um sistema *in vitro* composto por nutrientes e fatores essenciais para a sua sobrevivência (ALVES; GUIMARÃES, 2010). A tentativa de realizar uma cultura celular iniciou no século XIX, quando Wilhelm Roux demonstrou que células embrionárias de galinha poderiam ser mantidas em cultivo fora do organismo em solução salina (ROUX, 1885). Em 1907, Ross Granville Harrison provou que as fibras nervosas eram formadas a partir de células nervosas. O estudo levou em consideração as necessidades básicas das células e a realização dos experimentos proporcionou às células em cultivo condições para que estas pudessem ser viáveis fora do organismo original (HARRISON et al., 1907). Já em 1912, Alexis Carrel descobriu a necessidade da troca de nutrientes nos frascos de cultura para que as células pudessem ser cultivadas por maiores períodos de tempo (CARREL, 1912).

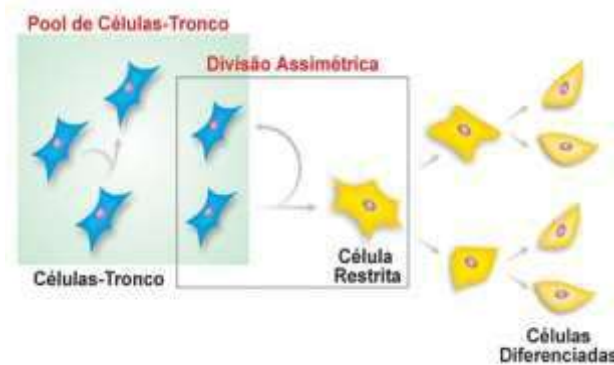
Em 1951, George Otto Gey estabeleceu a primeira linhagem imortal de células, a linhagem HeLa, cultivadas a partir de células de amostras de tecido tumoral humano (de útero), que é utilizada até hoje em diversas áreas de pesquisa (KHAN, 2011). Em 1962, Nakamura e colaboradores estabeleceram a linhagem VERO, originada de células epiteliais renais de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*), que foram aprovadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e são utilizadas como modelo de pesquisa na produção de vacinas (ALVES; GUIMARÃES, 2010; BARBOSA et al., 2015; KISTNER, 1998).

Atualmente, a cultura de células não se limita ao estudo do comportamento de determinado tecido ou célula *in vitro* (ALVES; GUIMARÃES, 2010). O cultivo celular tem grande importância no desenvolvimento de tratamentos para muitas doenças (BARBOSA et al., 2015). As pesquisas com células-tronco tem se mostrado cada vez mais uma importante ferramenta de estudo no desenvolvimento de novas técnicas de tratamento que visam proporcionar melhor qualidade de vida aos pacientes com lesões e/ou degenerações teciduais (BARBOSA et al., 2015).

1.2 CÉLULAS-TRONCO

Células-tronco (SC, do inglês *stem cells*) são células indiferenciadas que possuem capacidade de multiplicação mantendo seu estado indiferenciado ou podem ser capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares (BYDLOWSKI et al., 2009; DESIDÉRIO, 2017; LANCE, 2013).

Figura 1 – Potencial das células-tronco. As células-tronco possuem a característica de divisão assimétrica, podendo originar células indiferenciadas e células com capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares.

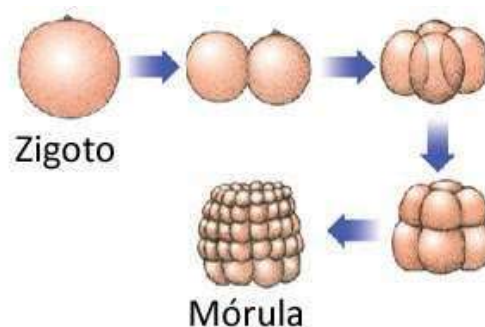


Fonte: Zago; Covas, 2006.

As SC são classificadas de acordo com a sua origem de obtenção: (a) células-tronco embrionárias, que são isoladas de estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (CIRNE-LIMA, 2007) ou (b) células-tronco adultas, obtidas a partir de tecidos adultos. Também podem ser classificadas de acordo com seu potencial de diferenciação (CIRNE-LIMA, 2007; DESIDÉRIO, 2017; LANCE, 2013), podendo ser:

- a) Células-tronco totipotentes que originam todos os tipos de células, inclusive tecidos embrionários e extraembrionários. Essa característica é exclusiva do zigoto e do embrião até o estágio de mórula (DESIDÉRIO, 2017; LANCE, 2013);

Figura 2 – As células-tronco totipotentes podem ser obtidas do zigoto ou do embrião até o estágio de mórula e são capazes de originar tecidos embrionários e extraembrionários.



Fonte: Agnes, 2014.

- b) Células-tronco pluripotentes que são encontradas no embrião, no estágio de blastocisto, e possuem a capacidade de gerar células dos três folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma), podendo originar todos os tipos de tecido, exceto os extraembrionários, como por exemplo a placenta (CIRNE-LIMA, 2007; DESIDERIO, 2017; LANCE, 2013);

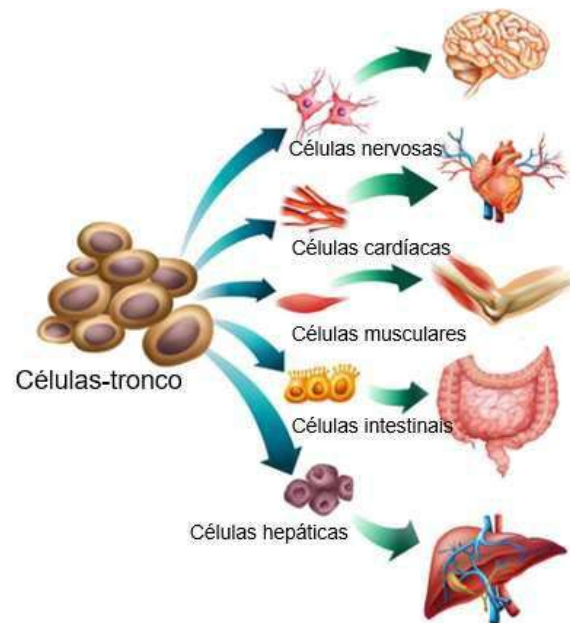
Figura 3 - Células-tronco pluripotentes são originadas da massa celular interna do blastocisto e possuem a capacidade de originar quase todos os tipos celulares, exceto os extraembrionários.



Fonte: Belan, 2014.

- c) Células-tronco multipotentes que são capazes de originar vários tipos de células, são encontradas em todo o corpo, sendo a medula óssea, o cordão umbilical e o tecido adiposo alguns exemplos de fontes de extração dessas células (CIRNE-LIMA, 2007; DESIDERIO, 2017; LANCE, 2013); ou

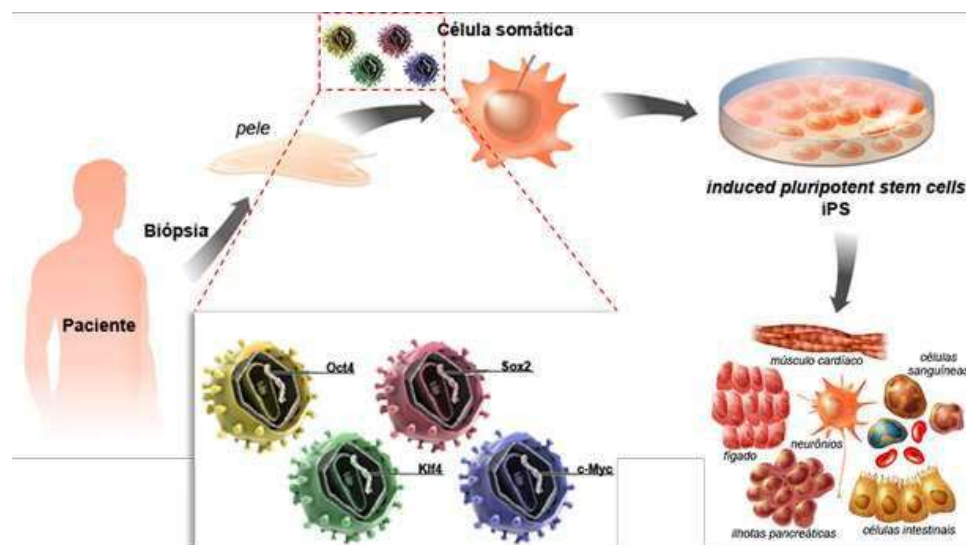
Figura 4 - Células-tronco multipotentes podem ser extraídas de diversas fontes (tecido adiposo, medula óssea, polpa dentária e etc.), e são capazes de originar diversos tipos celulares, formando diferentes tecidos.



Fonte: adaptado de Sordelli, 2017.

- d) Células-tronco de pluripotência induzida (iPS, do inglês *induced Pluripotent Stem-Cells*) que são células adultas reprogramadas geneticamente que tornam-se semelhantes às células-tronco embrionárias (DESIDERIO, 2017; LANCE, 2013).

Figura 5 - Reprogramação de células adultas para tornarem-se semelhantes às células-tronco embrionárias



Fonte: IPCT, 2013.

1.3 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células-tronco mesenquimais (MSC, do inglês *mesenchymal stem cells*) foram descritas pela primeira vez por Friedenstein et al. em 1966 (AFANASYEV; ELSTNER; ZANDER, 2009) e são células multipotentes que se destacam devido a sua aderência seletiva (BYDLOWSKI et al., 2009) e a sua alta plasticidade, podendo se diferenciar em diversos tipos celulares, como osteoblastos, condrócitos, adipócitos, neurônios, células epiteliais e outras, dependendo das condições de cultivo (ALVES et al., 2017; BLAU et al., 2001; CHEN; HE; LU, 2018; MIANA; GONZÁLEZ, 2018).

Podemos isolar células-tronco mesenquimais de diversas fontes, em maior ou menor quantidade, como por exemplo: medula óssea, pele, sangue periférico, fígado, pâncreas, vasos sanguíneos, pulmão, líquido amniótico (BOBIS; JAROCHA; MAJKA, 2006), sangue do cordão umbilical (BOBIS; JAROCHA; MAJKA, 2006; URANIO et al., 2011); porém, o tecido adiposo é a principal fonte de MSC devido a possibilidade de obtenção de maior quantidade de tecido e a facilidade de extração das células (ALVES et al., 2017). As MSC possuem a capacidade de se expandir diversas vezes em cultura, mantendo seu potencial de crescimento e pluripotencialidade (BYDLOWSKI et al., 2009); porém, conforme o aumento do tempo de cultivo, pode-se observar a diminuição da proliferação das células-tronco mesenquimais.

Existem três principais processos envolvidos na diferenciação das MSC:

- a) a sinalização parácrina, na qual, devido à proximidade entre elas, ocorre secreção de citocinas que induzem a diferenciação (BYDLOWSKI et al., 2009; WAGERS; CHRISTENSEN; WEISSMAN, 2002);
- b) a divisão (mitose) assimétrica: onde a célula-mãe origina uma célula idêntica a ela e outra célula especializada (BYDLOWSKI et al., 2009); e
- c) a regulação gênica, que pode envolver acetilação de cromatina regulado pela histona-acetil-transferase (que promove a acetilação, ou seja, o desligamento do gene) e a histina-desacetilase (que remove os grupos acetila, tornando os genes mais ativos) ou então pode envolver a metilação de sequências gênicas, principalmente das regiões promotoras que fazem com que o gene regulado por elas não seja expresso enquanto esta região se encontrar metilada (BYDLOWSKI et al., 2009).

Muitos sinais químicos e biológicos são responsáveis pela indução da diferenciação *in vitro* das células-tronco mesenquimais. O TGF- β (do inglês *Transforming Growth Factor beta*) é o principal fator indutor da diferenciação de MSC em condrócitos; várias vias de sinalização

intracelular são ativadas e induzem fatores de transcrição (SOX9, SOX5 e SOX6) que levam à produção de proteínas de matriz celular, incluindo colágeno do tipo II, importante na formação de cartilagem (BYDLOWSKI et al., 2009; NARDI, 2010). Meio suplementado com β -glicerolfosfato pode induzir a diferenciação osteogênica. Dexametasona, insulina e indometacina estimulam, por sua vez, o potencial de diferenciação adipogênico (NARDI, 2010).

Quando expostas a outros tipos celulares ou a condições que mimetizam ambientes de tecidos que sofreram lesões, as MSC são capazes de responder e modular suas funções. Demonstram, além disso, quimiotaxia *in vitro* pelo fator derivado de estroma (SDF1), PDGF (*platelet-derived growth factor*), *insulin-like growth factor-1*, interleucina-8 e fator de necrose tumoral α (TNF α) (VIDOR, 2015).

Segundo a *International Society for Cellular Therapy*, as MSC devem expressar os marcadores CD105, CD73 e CD90, e não devem expressar CD34 (marcador de células-tronco hematopoiética), CD45 (marcador de células hematopoiéticas), CD14 ou CD11b (marcador de célula imune), CD79 ou CD19 e HLA classe II em mais de 95% das células em cultura (BYDLOWSKI et al., 2009; VIDOR, 2015).

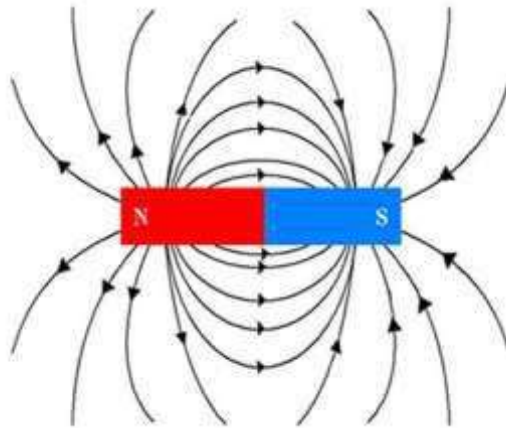
1.4 CAMPO MAGNÉTICO

As primeiras observações de fenômenos magnéticos remetem aos gregos, na cidade de Magnésia (LUZ; ÁLVARES, 2010). Eles observaram um tipo de pedra que era capaz de atrair pedaços de aços. Hoje, essas pedras são denominadas ímãs naturais e sabe-se que são constituídas por óxido de ferro. O termo ‘magnetismo’ foi usado para designar o estudo das propriedades desses ímãs, em virtude do nome da cidade onde foram descobertos (LUZ; ÁLVARES, 2010).

Campos magnéticos (MF, do inglês *magnetic field*) podem ser criados por correntes elétricas contínuas ou variáveis, ou por substâncias que possuem propriedades atômicas, moleculares e estruturais capazes de produzir um campo magnético, que podem transformar um material em um ímã (DESIDÉRIO, 2017).

O magnetismo dos ímãs sempre possuem dois polos: norte (N) e sul (S). O polo N do ímã é a extremidade que, quando o ímã pode girar livremente, aponta para o norte geográfico da Terra, e a extremidade que aponta para o sul geográfico é o polo S do ímã (LUZ; ÁLVARES, 2010). Por convenção, no campo exterior a um ímã, as linhas de campo saem pelo polo norte e entram pelo polo sul.

Figura 6 - Campo magnético de um ímã. Por convenção, as linhas do campo magnético saem do polo Norte e entram no polo Sul do ímã.



Fonte: Silva, 2017.

Quando dois ímãs, de polos diferentes (N e S), estão frente a frente, ocorre atração dos campos, formando um Campo Magnético Estático (SMF, do inglês *static magnetic field*) (DESIDÉRIO, 2017). Por outro lado, quando ímãs de polos iguais (N-N ou S-S) encontram-se frente a frente, ocorre repulsão, originando um Campo Magnético Compensado (CMF, do inglês *compensated magnetic field*), com intensidade de campo magnético praticamente desprezível (DESIDÉRIO, 2017).

Campos magnéticos estáticos são considerados mais adequados para observar os efeitos biológicos e compreender os mecanismos desses efeitos devido sua menor variabilidade de parâmetros (ZHANG et al., 2017).

1.5 CAMPO MAGNÉTICO *IN VIVO*

Os seres vivos estão expostos a campos elétricos e magnéticos de variadas intensidades, que são produzidos por aparelhos elétricos, linhas de energia, eletroímãs e tudo o que transporta corrente elétrica (ZANNELLA, 1998). A produção de alumínio cria um fluxo magnético de 10 a 60mT (militesla); nos sistemas de segurança o fluxo pode chegar até 1mT; trens e metrô geram um MF de 0,7 a 1 mT e, em exames de ressonância magnética, o paciente pode estar envolto por um campo magnético de até 2T (Tesla) (ZANNELLA, 1998). Também são produzidos campos magnéticos nos tecidos muscular, nervoso e cardíaco (com amplitudes entre 10^{-9} T e 10^{-15} T) devido aos movimentos iônicos e potenciais de ação (KRUEGER-BECK et al., 2010). Na natureza, a migração das aves é orientada pelo campo magnético da Terra (WANG

et al., 2009), que pode variar de $25\mu\text{T}$ próximo ao Equador até $65\mu\text{T}$ próximo aos polos (DESTEFANIS et al., 2015; ZANNELLA, 1998), e também por campos gerados por aparelhos elétricos (KRUEGER-BECK et al., 2010).

A estimulação magnética (MS, do inglês *magnetic stimulation*) em seres humanos iniciou em 1985, quando Barker comprovou a influência da estimulação magnética no córtex motor do sistema nervoso central, SNC, (BARKER; JALINOUS; FREESTON, 1985). A MS transcraniana repetitiva (rTMS, do inglês *repetitive transcranial magnetic stimulation*) é uma técnica de neuromodulação não-invasiva, que cria campos magnéticos de diferentes intensidades e tem sido utilizada no tratamento de diversos distúrbios físicos e psicológicos, em doenças que afetam o córtex motor, na doença de Parkinson e de Alzheimer, em casos de epilepsia, dores crônicas, esclerose múltipla e depressão (CHAE; KIM, 2017; NOOHI; AMIRSALARI, 2016; O'REARDON et al., 2007).

Existem duas categorias de campos magnéticos utilizados na estimulação magnética transcraniana repetitiva: rTMS de baixa frequência (≤ 1 Hz) e a rTMS de alta frequência (> 1 Hz) (CHAE; KIM, 2017; CHERVYAKOV et al., 2015). O uso dessa técnica no tratamento da doença de Parkinson, por exemplo, estimula a produção de dopamina e também afeta o número de receptores, como a redução do número de receptores beta-adrenérgicos no córtex frontal, mas aumenta o número de receptores NMDA (N-metil D-aspartato) no tálamo, amígdala e no córtex parietal (CHERVYAKOV et al., 2015).

1.6 CAMPO MAGNÉTICO *IN VITRO*

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de compreender os efeitos de campos magnéticos em culturas celulares. Para analisar os efeitos de campos magnéticos *in vitro*, é necessário classificar os fluxos magnéticos gerados. Existem quatro classificações para as densidades dos campos magnéticos estáticos: fracos ($<1\text{mT}$); moderados (de 1mT a 1T); fortes (de 1T a 5T) e ultrafortes ($> 5\text{T}$) (ROSEN, 2003).

A estimulação magnética estática pode inibir ou estimular a proliferação celular, migração e a diferenciação de células-tronco (FINI et al., 2002; PAUN et al., 2018; ROSEN, 1993; YUN et al., 2016), aumentando o fluxo de cálcio pela membrana celular, promovendo uma cicatrização mais rápida e eficaz (PAUN et al., 2018).

Estudos realizados avaliando o efeito de campo magnético estático de intensidade moderada (0,5T) em células renais de ratos, demonstraram que células tratadas apresentaram diminuição na proliferação celular (BUEMI et al., 2001). Por outro lado, observou-se o aumento de células necróticas em comparação com as células não estimuladas. Já no tratamento em astrócitos corticais, também utilizando um SMF de intensidade moderada (0,3T), foi observado o inverso: as células estimuladas apresentaram maior proliferação e morte celular. Isso sugere que diferentes tipos celulares respondem de diferentes formas ao estímulo do campo magnético estático (BUEMI et al., 2001; MEDEIROS, 2017).

Zhang et al. (2017) avaliaram o efeito de SMF (1T) em diversas linhagens celulares. Houve aumento na densidade celular nas linhagens de células pulmonares saudáveis (HSAEC2-KT, HSAEC30-KT E HBEC30-KT). Por outro lado, nas linhagens tumorais de câncer de cólon, pulmão, próstata, mama e pele, foi possível observar a redução na densidade celular.

2 JUSTIFICATIVA

Este trabalho é uma ramificação de um projeto de mestrado, intitulado “Efeito da estimulação magnética estática em linhagem celular de neuroblastoma e neuroblastoma diferenciado”, com autoria de Helouise Richardt Medeiros, sob orientação da Prof^a Dr^a Iraci Lucena da Silva Torres e coorientação da Prof^a Dr^a Elizabeth Obino Cirne-Lima, que foi desenvolvido em parceria com o Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular.

A principal linha de pesquisa do grupo é terapia celular, com células-tronco mesenquimais, para diversas patologias. Tendo em vista resultados positivos em proliferação de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC) com estimulação elétrica e magnética encontrados na literatura (HERNÁNDEZ-BULE et al., 2014; MAREĐZIAK et al., 2014, 2017), a finalidade do presente projeto é avaliar o efeito da estimulação magnética estática em ADSC derivadas de suínos, observando a capacidade de diferenciação celular *in vitro*, a viabilidade, a morfologia nuclear, a proliferação e a migração celular, para avaliação da possibilidade de adoção de terapia celular com ADSC magneticamente estimuladas para potencialização da regeneração de tecidos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Observar a resposta das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de suínos após estimulação magnética estática (0,3T).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Comparar a capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC) de suínos, após a estimulação magnética;
- b) Mensurar as taxas de viabilidade celular das ADSC de suínos submetidas à estimulação magnética, através da técnica de exclusão com Azul de Trypan;
- c) Mensurar as taxas de viabilidade celular das ADSC de suínos após a estimulação magnética, através do ensaio de MTT;
- d) Avaliar a morfologia nuclear das ADSC submetidas à estimulação magnética, através da técnica de coloração com DAPI;
- e) Avaliar a capacidade de proliferação celular das ADSC de suínos submetidas à estimulação magnética, através do ensaio de Sulforodamina B;
- f) Comparar a capacidade de migração das ADSC de suínos após a estimulação magnética, através do ensaio de *Wound Healing*.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

A ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA AUMENTA A VIABILIDADE E A CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO DE SUÍNOS

Débora Helena Zanini Gotardi^{1,3}, Raquel Almeida Schneider^{2,3}, Cristina Palma Kuhl³, Markus Berger³, Paula Barros Terraciano³, Elizabeth Obino Cirne-Lima³

¹Faculdade de Biomedicina, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

²Faculdade de Biomedicina, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

³Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

Correspondência para o autor: Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Santa Cecília, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil.

e-mail: dgotardi@hcpa.edu.br

Resumo

A estimulação magnética estática pode influenciar de diferentes formas as culturas celulares, inibindo ou estimulando a proliferação e a migração celular, alterando a viabilidade das células e interferindo no potencial de diferenciação de células-tronco. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito *in vitro* do campo magnético de intensidade moderada (0,3T) em células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC) de suínos, analisando o potencial de diferenciação das células, a viabilidade, morfologia nuclear, a proliferação e a migração celular. Após a exposição ao campo magnético, as ADSC mantiveram sua capacidade de diferenciação em adipócitos e osteoblastos. As células magneticamente estimuladas apresentaram um aumento na taxa de viabilidade celular, comparada com as células que não receberam o estímulo. A estimulação magnética não induziu apoptose nas células em cultura e não interferiu na proliferação. A migração celular aumentou significativamente nas células estimuladas por 24 horas.

Palavras-chave: células-tronco, estimulação magnética estática, diferenciação celular, viabilidade celular, apoptose, proliferação celular, migração celular.

Abstract

Static magnetic stimulation can influence cell cultures in different ways, inhibiting or stimulating cell proliferation and migration, altering cell viability and interfering with the potential for differentiation of stem cells. The aim of this study was to evaluate the in vitro effect of the magnetic field in moderate intensity (0.3T) on porcine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (ADSC), analyzing the potential cell differentiation, viability rate, nuclear cell morphology, proliferation and cell migration. After exposure to the magnetic field, the ADSC maintained their capacity of differentiation in adipocytes and osteoblasts. Magnetically stimulated cells showed an increase in viability rate compared to the cells that did not receive the stimulus. Magnetic stimulation did not induce apoptosis in cells cultured and did not interfere with proliferation. Cell migration increased significantly in the stimulated cells in 24 hours.

Key words: stem cells, static magnetic field, cell differentiation, cell viability, apoptosis, cell proliferation, cell migration.

Introdução

Células-tronco mesenquimais (MSC, do inglês *mesenchymal stem cells*) são células multipotentes que possuem aderência seletiva (Bydlowski et al. 2009; Francis et al. 2018), capacidade de auto renovação e alta plasticidade, podendo se diferenciar em diversos tipos celulares, como osteoblastos, condrócitos, adipócitos, neurônios, células epiteliais, entre outras linhagens, quando cultivadas em meios específicos (Blau et al., 2001; Monteiro et al. 2010; Alves et al. 2017; Zwolanek et al. 2017; Chen et al. 2018; Miana and González 2018). As principais fontes de MSC são a medula óssea e o tecido adiposo (Alves et al. 2017; Miana and González 2018; Francis et al. 2018). As células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSC, do inglês *adipose-derived stem cells*) são de fácil extração, devido a facilidade do acesso e a grande quantidade de tecido encontrado (Uemoto et al. 2015; Alves et al. 2017). Em virtude de seu potencial terapêutico e seu efeito imunomodulatório, as células-tronco tem se mostrado cada vez mais uma importante ferramenta no estudo do desenvolvimento de novas técnicas de tratamento que visam proporcionar melhor qualidade de vida aos pacientes com lesões e/ou degeneração tecidual (Uemoto et al. 2015; Ciuffi et al. 2017).

A estimulação magnética estática (SMF, do inglês *static magnetic field*) pode estimular ou inibir a proliferação e a migração de diversos tipos celulares, podendo ainda influenciar a

diferenciação de células-tronco (Schäfer et al. 2010; Marędziak et al. 2014; Yun et al. 2016; Paun et al. 2018). Muitos estudos demonstram que a SMF atua de maneira distinta na proliferação, migração e na viabilidade celular de diferentes linhagens (Rosen 2003; Schäfer et al. 2010; Wang et al. 2016; Zhang et al. 2017; Prasad et al. 2017; Paun et al. 2018), sugerindo que diferentes tipos celulares respondem de diferentes formas ao estímulo do campo magnético.

O presente estudo busca compreender como as ADSC de suínos respondem à estimulação magnética de intensidade moderada 0,3T (Tesla), observando a influência desta na capacidade de diferenciação celular *in vitro*, na viabilidade, na proliferação e na migração celular, a fim de verificar a possibilidade da adoção de terapia celular com células magneticamente estimuladas para potencialização da regeneração de tecidos.

Metodologia

Isolamento e expansão das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC) de suínos

As células foram obtidas e caracterizadas anteriormente, conforme Garcez, 2018. As células foram descongeladas e cultivadas em estufa a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO₂ e meio DMEM low (Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose; GIBCO[®] by Life Technologies, NY, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB; GIBCO[®], NY, EUA), e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina 10000 U/MI; GIBCO[®] by Life Technologies, NY, EUA) até as passagens 4 e 5. Após atingir a confluência de 90% a 100%, foram plaqueadas na concentração de 1×10^4 células por poço, em placas de 24 poços, para a realização dos experimentos.

Estimulação magnética das ADSC

A estimulação magnética da cultura celular seguiu a padronização do protocolo realizado por Medeiros, 2017 utilizando um suporte para placa de cultura com 6 imãs de neomídio-ferro-bromo (NeFeB) com formato cilíndrico de 12mm de diâmetro por 6mm de altura, com um afastamento adequado para que os campos magnéticos não interajam. As células foram estimuladas durante 24 horas por um campo magnético estático de 0,3 Tesla (T). O ajuste do campo magnético foi realizado com o auxílio de um medidor digital de campo magnético (Gaussímetro) com sensor de efeito Hall.

Diferenciação das ADCS

As células-tronco foram diferenciadas em adipócitos e osteoblastos a partir da adição de reagentes específicos no meio de cultura, de acordo com os protocolos descritos por Meirelles e Nardi (2003). Para detecção da diferenciação, as células foram fixadas e coradas com corantes específicos para detecção adipogênica: Oil Red (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, EUA); e osteogênica: Vermelho de Alizarina (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, EUA). As imagens foram obtidas com o auxílio de microscópio invertido (Nikon Eclipse TE2000 U) com câmera acoplada (Nikon Digital Sight).

Ensaio de viabilidade celular pela técnica de exclusão com azul de trypan

Para a mensuração da viabilidade, através da contagem celular, as células foram submetidas à dissociação com Tripsina – EDTA 0,25% (GIBCO[®] by Life Technologies, NY, EUA) por 1 minuto e centrifugadas a 2000g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 1000µL de meio DMEM suplementado com 10% SFB. As células foram diluídas na proporção 1:1 com azul de trypan 0,4% (VETEC, RJ, BRA) e contadas em câmara de Neubauer, conforme protocolo Trypan Blue (Sigma).

Viabilidade celular pela técnica de MTT

A viabilidade das ADSC também foi mensurada pelo ensaio de MTT (3-[4,5-methylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, EUA). As células foram lavadas com PBS e em seguida foi adicionado 500µL da solução de MTT na concentração 0,5mg/mL. A placa contendo as células foi incubada em estufa a 37°C e uma atmosfera de 5% de CO₂ por 2 horas. Após esse período, foi adicionado 500µL de dimetil-sulfóxido (DMSO, SIGMA Life Science, St. Louis, EUA) em cada poço. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro a 540nm.

Avaliação do núcleo celular

Para a avaliação da morfologia do núcleo celular, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos. Após a fixação, as células foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente com 20µL de DAPI (Fluoroshield with DAPI – SIGMA-ALDRICH, St. Louis, EUA) em cada poço. As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência.

Avaliação de proliferação celular com Sulforodamina B

Para avaliação da proliferação celular, foi realizado o ensaio de Sulforodamina B. As células foram fixadas com ácido tricloroacético 50% durante 1 hora a 4°C. Após a fixação, os

poços foram secos em fluxo de ar e em seguida, foi adicionado 200µL de Sulforodamina B (0,4% em ácido acético 1%), em cada poço, e a placa foi incubada por 25 minutos, a temperatura ambiente. Por fim, as células foram lavadas com ácido acético, para retirada do excesso de corante, e em seguida adicionado 200µL de tampão Tris 10mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 510nm.

Ensaio de migração celular

Para observar a migração celular, realizamos o ensaio de *Wound Healing*, conforme o protocolo descrito por Chen, 2012 (*Scratch Wound Healing Assay, Bio-protocol*). Após atingir a confluência máxima em todos os poços, foi realizada uma fenda, com o auxílio de uma ponteira de 1000µL. As imagens foram obtidas nos tempos 0, 24 e 48 horas, com o auxílio do microscópio invertido (Nikon Eclipse TE2000U) com câmera acoplada (Nikon Digital Sight).

Análise estatística

Os dados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil. A análise estatística foi realizada através do software SPSS (versão 18.0; IBM). Utilizamos o teste *t de Student* e o teste Qui-quadrado. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

Resultados

Diferenciação das ADSC

Após a indução da diferenciação e da coloração específica, foi possível observar padrões claros de diferenciação em dois tipos celulares, adipócitos (figura 1) e osteoblastos (figura 2), tanto nos grupos controle quanto nas células estimuladas por 24 horas.

Viabilidade celular pela técnica de exclusão com Azul de Trypan

A contagem de células viáveis foi realizada em ambos os grupos, controle e estimuladas por 24 horas. Foi possível observar um aumento na viabilidade celular no grupo exposto ao campo magnético (figura 3; $p < 0,05$).

Viabilidade celular pela técnica de MTT

A taxa de viabilidade celular foi avaliada tanto na presença quanto na ausência de estimulação magnética e foi mensurada a partir das células controles, consideradas como 100%.

A exposição ao campo magnético aumentou a viabilidade das ADSCs de suínos ($p < 0,05$), quando comparadas às células que não receberam o estímulo (figura 4).

Avaliação do núcleo celular

A partir da coloração com DAPI foi possível quantificar os núcleos celulares e classificá-los quanto a morfologia nuclear em núcleos normais e núcleos apoptóticos. No grupo controle foi identificado um total de 364 núcleos, onde 87,6% destes são classificados como normais e 1,1% estavam em processo apoptótico (tabela 1). Já nas células expostas ao campo magnético, foram observados 521 núcleos, onde 95,7% destes eram normais e apenas 0,4% estavam em processo de apoptose.

Avaliação da proliferação celular pela técnica de Sulforodamina B

Pode-se notar um pequeno aumento na densidade celular nas células controle, quando comparadas às expostas ao campo magnético (figura 5). Porém, não foram encontradas diferenças significativas na quantificação proteica nas culturas expostas ou não, sugerindo que o campo magnético não influencia na proliferação celular.

Avaliação da migração celular pelo ensaio de Wound Healing

As análises foram realizadas nos tempos 0, 24 e 48 horas após a confecção do *scratch*. Foi possível observar uma maior migração celular pelas células estimuladas magneticamente. Em t24h (24 horas após a confecção da fenda), a área do *scratch* realizado nos poços do grupo estimulada 24 horas, foi menor quando comparado com as células controles ($p < 0,05$; figura 6), indicando maior capacidade de migração das células expostas ao campo magnético. Já na análise t48h (48 horas após a confecção da fenda), não havia mais espaço livre, sem as células, na região do *scratch*, tanto nas células estimuladas como nas células controles.

Discussão

Terapias com células-tronco mesenquimais têm sido muito discutidas e estudadas nos últimos anos. Alguns estudos demonstram que a utilização de MSC previamente expostas a campos magnéticos podem otimizar a regeneração tecidual (Rosen 2003; Marędziak et al. 2014), proporcionando maior qualidade de vida aos pacientes com lesões.

Neste estudo avaliamos o efeito da estimulação magnética de intensidade moderada na cultura de ADSC de suínos. Os resultados demonstram que após a exposição ao campo

magnético estático (SMF), as ADSC de suínos tiveram preservadas sua capacidade de se diferenciar em dois tipos celulares distintos, comprovando que sua plasticidade não foi prejudicada após a estimulação de 0,3T. Esse resultado corrobora com os demais encontrados na literatura. Em 2010, Schäfer et al. realizaram a diferenciação de células-tronco mesenquimais de humanos em adipócitos, condrócitos e osteoblastos, após estimulação magnética de 0,6T por 24 horas, e observaram que a capacidade de diferenciação não foi prejudicada após essa exposição ao SMF. Yamamoto et al. (2003) relataram que SMF entre 0,28 e 0,34T estimula a formação óssea a partir da diferenciação e a ativação de osteoblastos. O estudo realizado por Kim et al. (2015) analisou o efeito de campo magnético de intensidade fraca e moderada (entre 0,03 e 0,5T, respectivamente) em MSC derivadas de medula óssea de humanos e os resultados obtidos demonstraram que a estimulação magnética promoveu a diferenciação das MSC em osteoblastos.

Para mensuração da viabilidade celular foram realizados dois ensaios, a contagem do número de células viáveis e o ensaio de MTT. Em ambas as técnicas foi possível observar um aumento na taxa viabilidade das células estimuladas magneticamente, comparado com as células que não receberam o estímulo. O estudo publicado por Schäfer et al. (2010) demonstrou que, MSC derivadas de medula óssea de humanos estimuladas magneticamente (0,6T), SMF não influenciam nas taxas de viabilidade das células, quando comparadas com as células controle. Por outro lado, Son et al. (2015) verificou que em até 72 horas de SMF de intensidade fraca (0,02T), a taxa de viabilidade, de MSC derivadas de medula óssea de humanos, permanece relativamente constante e semelhantes às células controle, sem estímulo. Estes dados demonstram que as diferentes fontes de obtenção de células-tronco e a intensidade de estímulos diferentes reagem de formas distintas entre si.

Avaliamos também a morfologia nuclear, tanto no grupo estimulado quanto no grupo controle, sem exposição ao campo magnético. Nas células estimuladas por 24 horas, dos 521 núcleos observados, 95,7% apresentaram núcleos de aspectos normais e apenas 0,4% em processo de apoptose. Já no grupo controle, sem estimulação, foram contados um total de 364 núcleos, onde 87,6% apresentaram morfologia normal e 1,1% com características apoptóticas. Esses resultados sugerem que a estimulação magnética não induziu apoptose nas células. O trabalho realizado por Wang et al. (2016) demonstrou que a aplicação de SMF (0,1T) não induz apoptose em cultura de cardiomiócitos. Já Baek et al. (2018) verificou que a estimulação magnética transcraniana repetitiva (rTMS, do inglês *repetitive transcranial magnetic stimulation*) de 0,5Hz, diminui a expressão de proteínas pró-apoptóticas e aumentou significativamente a expressão de proteínas anti-apoptóticas em células de neuroblastoma.

Em nosso estudo não foram encontradas diferenças significativas na proliferação de células expostas ao campo magnético, quando comparadas às células controle não estimuladas magneticamente. Diversos estudos anteriores demonstram que a estimulação magnética pode promover aumento ou diminuição na proliferação celular. Kim et al. (2015) demonstraram que campos magnéticos de intensidades fracas e moderadas (0,03 a 0,5T) promoveram a proliferação celular de MSC derivadas de medula óssea de humanos. Marędziak et al. (2014) compararam a proliferação de ADSC de cães e equinos após estimulação magnética de 0,5T. Eles observaram que, em resposta ao SMF, as ADSC de cães tiveram uma redução significativa na proliferação celular, e as ADSC de equinos, por outro lado, aumentaram sua proliferação significativamente. Já Zhang et al. (2017) avaliaram os efeitos de SMF (1T) em diversos tipos celulares. Eles demonstraram que a exposição ao campo magnético aumentou a proliferação celular de duas linhagens de células pulmonares de humanos. Por outro lado, em linhagens de células tumorais de cólon, pulmão, próstata, neuroblastoma (Medeiros, 2017) e mama, foi observada uma redução na proliferação celular após a exposição ao SMF. Estes resultados confirmam que diferentes tipos celulares respondem de diferentes formas a campos magnéticos estáticos.

Quanto à capacidade de migração celular, foi possível observar um aumento significativo ($p < 0,05$) no percentual de migração celular, nas células expostas ao campo magnético, 24 horas após a confecção da fenda. Em 2010, Schäfer et al. analisaram a capacidade de migração de MSC derivadas de medula óssea de humanos e observaram que a exposição ao campo magnético não interferiu na capacidade de migração das células em cultura.

Por fim, foi possível observar que o tipo celular, a fonte na qual as células-tronco são extraídas e a intensidade do campo magnético influenciam diretamente os efeitos do SMF na cultura celular. No caso das ADSC utilizadas no nosso trabalho (originadas de tecido adiposo de suínos), o campo magnético atuou de forma positiva nas culturas celulares.

Conclusões

Através dos ensaios realizados, é possível observar que a estimulação magnética de intensidade moderada (0,3T) preservou a plasticidade das ADSC de suínos, ou seja, as células mantiveram sua capacidade de diferenciação em adipócitos e osteoblastos. Após o estímulo, a taxa de viabilidade celular aumentou significativamente ($p < 0,05$), quando comparado com as células controle. Observamos também, que a estimulação não induz apoptose nas células. A proliferação celular mensurada foi semelhante entre os grupos e a capacidade de migração

celular nas culturas estimuladas magneticamente foi maior do que a capacidade de migração observada nas células controle sendo possível observar fechamento quase total da fenda 24 horas após a confecção da mesma.

Desta forma, os resultados obtidos nesse estudo indicam que a exposição ao campo magnético de intensidade moderada (0,3T) pode vir a ser utilizada de forma benéfica na estimulação magnética de células-tronco derivadas de tecido adiposo de suínos, para melhor atuação dessas células na regeneração de tecidos lesionados.

Referências

- Alves EGL, Serakides R, Rosado IR, et al (2017) Isolamento e cultivo de células tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo e da medula óssea de cães. *Ciência Animal Brasileira*. doi: 10.1590/1089-6891v18e-34050
- Baek A, Kim JH, Pyo S, et al (2018) The Differential Effects of Repetitive Magnetic Stimulation in an In Vitro Neuronal Model of Ischemia/Reperfusion Injury. *Front Neurol*. doi: 10.3389/fneur.2018.00050
- Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL (2009) Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 31:25–35. doi: 10.1590/S1516-84842009005000038
- Chen X, He Y, Lu F (2018) Autophagy in Stem Cell Biology: A Perspective on Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Stem Cells Int* 2018. doi: 10.1155/2018/9131397
- Ciuffi S, Zonefrati R, Brandi ML (2017) Adipose stem cells for bone tissue repair. *Clin Cases Miner Bone Metab* 14:217–226. doi: 10.11138/ccmbm/2017.14.1.217
- Francis SL, Duchi S, Onofrillo C, et al (2018) Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Use of Cartilage Tissue Engineering: The Need for a Rapid Isolation Procedure. *Stem Cells Int* 2018. doi: 10.1155/2018/8947548
- Kim E-C, Leesungbok R, Lee S-W, et al (2015) Effects of moderate intensity static magnetic fields on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bioelectromagnetics* 36:267–276. doi: 10.1002/bem.21903
- Marędziak M, Marycz K, Śmieszek A, et al (2014) The influence of static magnetic fields on canine and equine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 50:562–571. doi: 10.1007/s11626-013-9730-1
- Miana VV, González EAP (2018) Adipose tissue stem cells in regenerative medicine. *Ecancermedicalscience*. doi: 10.3332/ecancer.2018.822
- Monteiro BS, Neto NM, Carlo RJD (2010) Células-tronco mesenquimais. *Cienc. Rural* 40:238-245. doi: 10.1590/S0103-84782010000100040

- Paun I, Popescu R, Calin B, et al (2018) 3D Biomimetic Magnetic Structures for Static Magnetic Field Stimulation of Osteogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 19:495. doi: 10.3390/ijms19020495
- Prasad A, Teh DBL, Blasiak A, et al (2017) Static Magnetic Field Stimulation Enhances Oligodendrocyte Differentiation and Secretion of Neurotrophic Factors. *Scientific Reports*. doi: 10.1038/s41598-017-06331-8
- Rosen AD (2003) Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. *Cell Biochem Biophys* 39:163–173. doi: 10.1385/CBB:39:2:163
- Schäfer R, Bantleon R, Kehlbach R, et al (2010) Functional investigations on human mesenchymal stem cells exposed to magnetic fields and labeled with clinically approved iron nanoparticles. *BMC Cell Biology* 11:22. doi: 10.1186/1471-2121-11-22
- Son B, Kim HD, Kim M, et al (2015) Physical Stimuli-Induced Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Using Magnetic Nanoparticles. *Advanced Healthcare Materials*, p.1339-1347. doi:10.1002/adhm.201400835.
- Uemoto S, Fujimoto Y, Teratani T, et al (2015) Introduction of Mesenchymal Stem Cells for Liver Surgery (Hepatectomy and Transplantation). *Innovative Medicine*. Springer Japan, Tokyo, pp 281–293
- Wang J, Xiang B, Deng J, et al (2016) Inhibition of Viability, Proliferation, Cytokines Secretion, Surface Antigen Expression, and Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells by Seven-Day Exposure to 0.5 T Static Magnetic Fields. *Stem Cells Int*. doi: 10.1155/2016/7168175
- Yamamoto Y, Ohsaki Y, Goto T, et al (2003) Effects of static magnetic fields on bone formation in rat osteoblast cultures. *J Dent Res* 82:962–966. doi: 10.1177/154405910308201205
- Yun H-M, Ahn S-J, Park K-R, et al (2016) Magnetic nanocomposite scaffolds combined with static magnetic field in the stimulation of osteoblastic differentiation and bone formation. *Biomaterials* 85:88–98. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.035
- Zhang L, Ji X, Yang X, Zhang X (2017) Cell type- and density-dependent effect of 1 T static magnetic field on cell proliferation. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.14480
- Zwolaneck D, Satué M, Proell V, et al (2017) Tracking mesenchymal stem cell contributions to regeneration in an immunocompetent cartilage regeneration model. *JCI Insight*. doi: 10.1172/jci.insight.87322

Tabela

Tabela 1: Morfologia nuclear das ADSC.

	<i>Controle</i>		<i>Estimulada 24h</i>		
	Nº de núcleos	% de núcleos	Nº de núcleos	% de núcleos	p
Normal (N)	319	87,6	478	95,7	*p<0,05
Apoptose (SR)	4	1,1	4	0,4	-

*p<0,05. Realizado o teste Qui-quadrado (SPSS 18.0)

Legendas das figuras

Figura 7: Diferenciação adipogênica das ADSC. Após 21 dias de indução da diferenciação, foi realizada a coloração com Oil Red. É possível observar os vacúolos lipídicos em ambos os grupos, controle e estimulado 24 horas (imagens B e D), comprovando a plasticidade das células em cultura. As imagens A e C representam o controle não diferenciado de cada grupo.

Figura 8: Diferenciação osteogênica das ADSC. Após 21 dias de indução da diferenciação é possível observar, em ambos os grupos (controle e estimulado 24 horas), os osteoblastos. Eles secretam uma matriz extracelular rica em cálcio, que é corada com o corante Vermelho de Alizarina (imagens B e D). As imagens A e C representam o controle de cada grupo.

Figura 9: Viabilidade das ADSC. Após contagem celular pela técnica de exclusão com Azul de Trypan, foi possível observar um aumento no número de células viáveis no grupo magneticamente estimulado ($p=0,025$).

Figura 10: Viabilidade das ADSC. O grupo Estimulada 24h, que recebeu a estimulação magnética, apresentou um aumento na viabilidade celular ($p=0,024$) quando comparado ao grupo controle, que não recebeu estímulo do campo magnético ($p>0,05$).

Figura 11: Proliferação das ADSC. A absorbância gerada é diretamente proporcional a densidade celular. É possível observar um pequeno aumento na taxa de densidade nas células controle, comparado com as células magneticamente estimuladas, mas não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ($p>0,05$).

Figura 12 - A capacidade de migração das ADSC, estimuladas ou não, foi avaliada através do ensaio de *Wound Healing*. Em t24h (24 horas após a confecção da fenda), foi possível observar uma maior taxa de migração celular nas células estimuladas magneticamente ($p<0,05$, *Teste t de Student*), comparada com a taxa de migração das células que não receberam o estímulo.

Figuras

Figura 1:

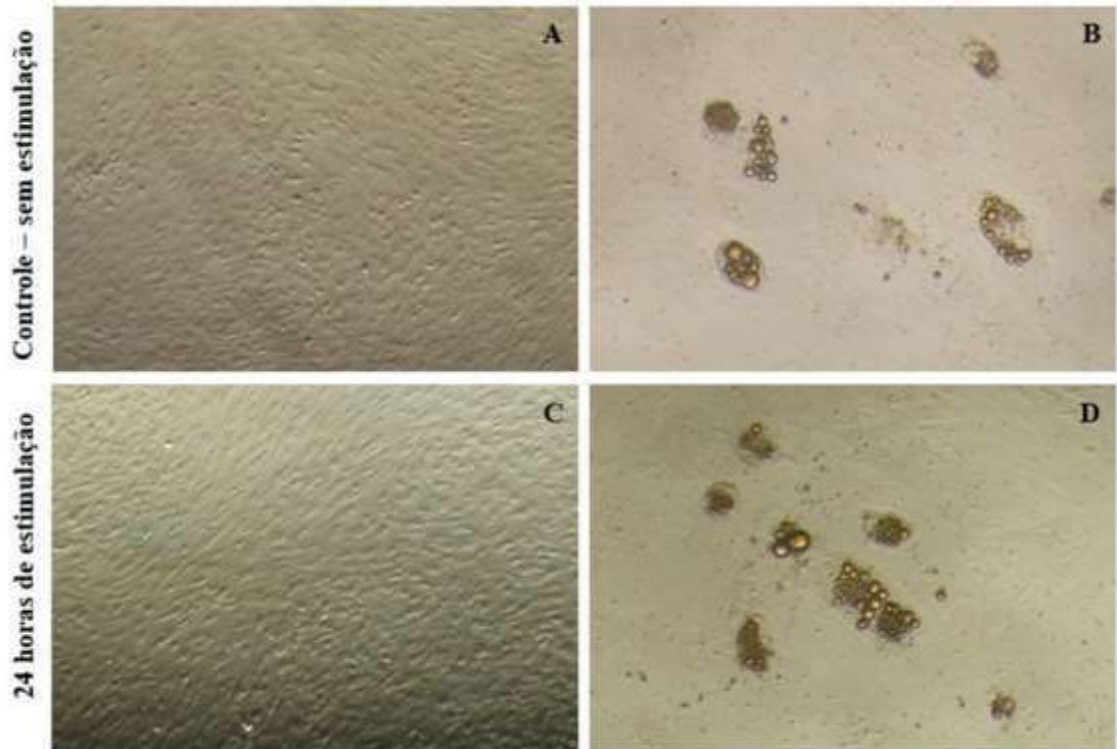


Figura 2:

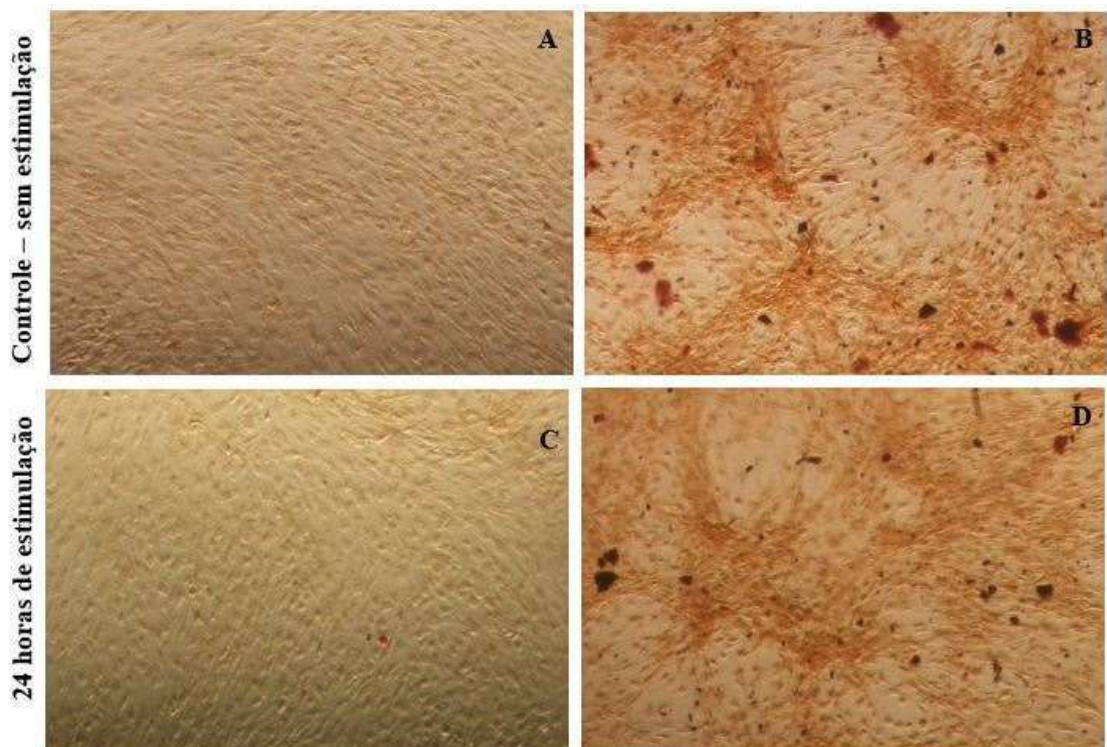


Figura 3:

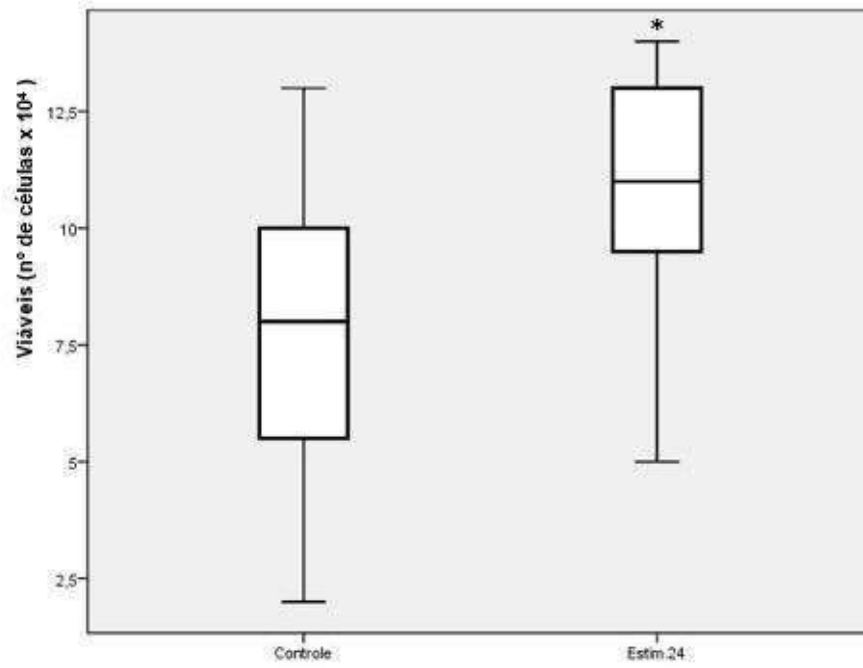


Figura 4:

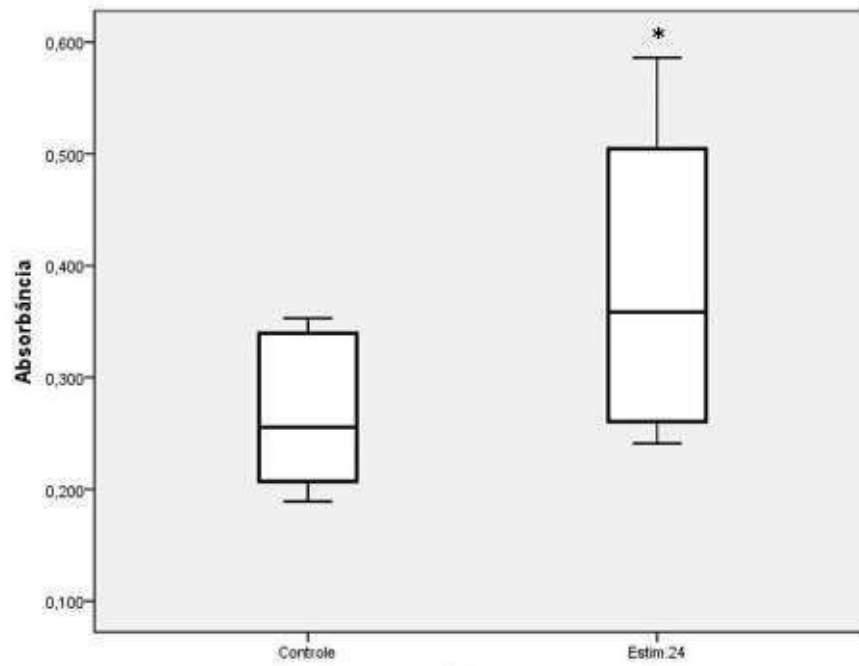


Figura 5:

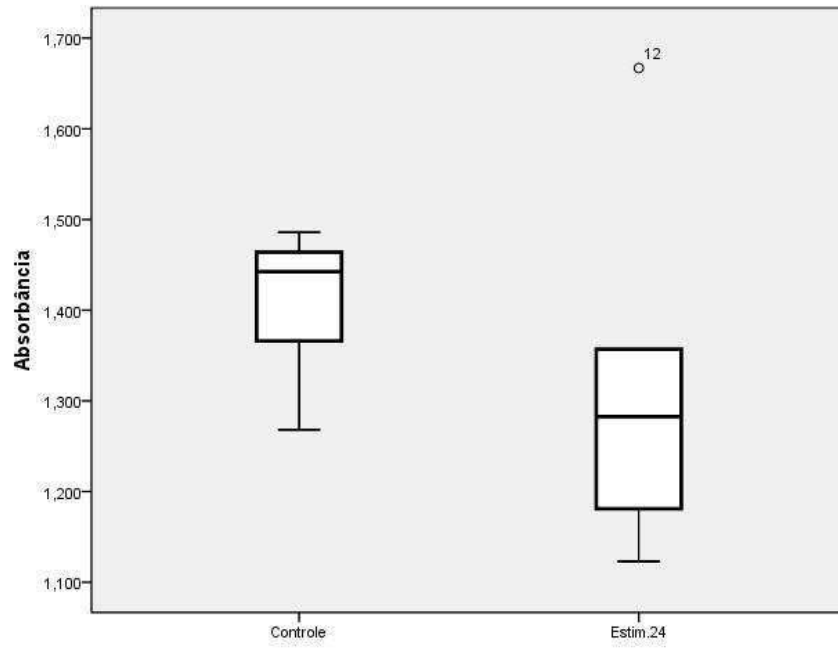
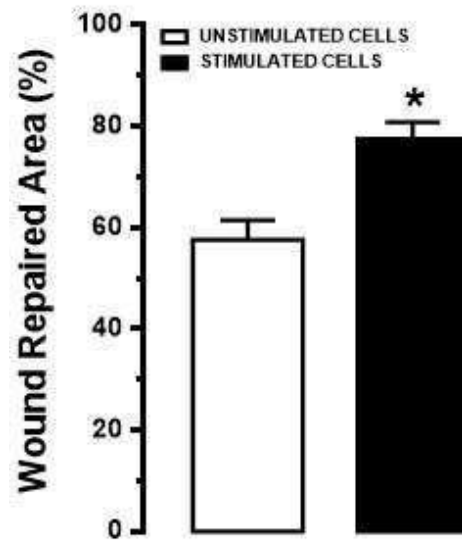


Figura 6:



5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, observamos a influência positiva da exposição ao campo magnético de 0,3T durante 24 horas nas culturas de células-tronco derivadas de tecido adiposo de suínos. As células mantiveram sua capacidade de diferenciação em dois tipos celulares, adipócitos e osteoblastos, demonstrando que a estimulação magnética não interferiu na plasticidade das ADSC. Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na viabilidade celular, nas células expostas ao campo magnético, quando comparada com a taxa de viabilidade das células controles. A estimulação não promoveu apoptose nas células estimuladas magneticamente e não interferiu na taxa de proliferação, sendo essa semelhante às células sem exposição ao campo magnético. Por outro lado, a capacidade de migração das ADSC estimuladas foi maior que as células controle.

Desta forma, observamos que diferentes tipos celulares respondem de formas distintas ao estímulo magnético e, que a exposição ao campo magnético de intensidade moderada (0,3T) pode ser utilizado de forma benéfica na cultura de ADSC, potencialmente melhorando a atuação dessas células em terapias na regeneração de lesão tecidual.

Nosso grupo pretende investigar possíveis lesões no DNA das ADSC de suínos estimuladas magneticamente, a fim de garantir a segurança dessas no tratamento de injúrias teciduais. Também serão realizados ensaios para confirmação da taxa de proliferação celular e morfologia nuclear das células. A quantificação da diferenciação em adipócitos e osteoblastos será realizada para investigar possíveis diferenças entre os grupos, células estimuladas ou não.

REFERÊNCIAS

AFANASYEV, B. V.; ELSTNER, E. E.; ZANDER, A. R. A. J. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. **Cellular Therapy and Transplantation**, v. 1, n. 3, p. 4, 2009.

AGNES, Giovanna. Embriologia. 2014. Disponível em: <<http://repassarinformacoes.blogspot.com/2014/09/biologia-embriologia.html>>. Acesso em: 17 jun. 2018.

ALVES, Emanuele Amorim; GUIMARÃES, Anna Christina Rosa. Cultivo celular. In: MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis (Org.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. v. 2, p. 215-253.

ALVES, E. G. L. et al. Isolamento e cultivo de células tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo e da medula óssea de cães. **Ciência Animal Brasileira**, v. 18, e-34050, p. 1-14, 21 ago. 2017.

BARBOSA, B. DE S. et al. History of development of the cultivation animal cells. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, n. 2, p. 334-347, 2015.

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, maio 1985.

BELAN, Fernando. **Tudo o que você precisa saber sobre células-tronco**. 2014. Disponível em: <<http://biologiamais.com.br/embriologia/tudo-o-que-voce-precisa-saber-sobre-celulas-tronco-37.html>>. Acesso em: 17 jun. 2018.

BLAU, H.m.; BRAZELTON, T.r.; WEIMANN, J.m.. The Evolving Concept of a Stem Cell. **Cell**, v. 105, n. 7, p. 829-841, jun. 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00409-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00409-3)>. Acesso em: 22 jun. 2018.

BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Mesenchymal stem cells**, v. 44, n. 4, p. 215-30, 2006.

BUEMI, M. et al. Cell proliferation/cell death balance in renal cell cultures after exposure to a static magnetic field. **Nephron**, v. 87, n. 3, p. 269–273, mar. 2001.

BYDŁOWSKI, S. P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 25–35, maio 2009.

CARREL, A. On the permanent life of tissues outside of the organism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 15, n. 5, p. 516–528, 1 maio 1912.

CHAE, K.-S.; KIM, Y.-H. Potential Impact of Geomagnetic Field in Transcranial Magnetic Stimulation for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 11, 27 set. 2017.

CHEN, X.; HE, Y.; LU, F. Autophagy in Stem Cell Biology: A Perspective on Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. **Stem Cells International**, v. 2018, 9131397, 21 jan. 2018.

CHERVYAKOV, A. V. et al. Possible Mechanisms Underlying the Therapeutic Effects of Transcranial Magnetic Stimulation. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 9, 16 jun. 2015.

CIRNE-LIMA, E.O. Stem Cells. **Revista HCPA**, v.27, n.3, p. 66-73, 2007.

DESIDÉRIO, David Lucas. **Efeito de Campos Magnéticos Estáticos e Compensados na Proliferação Celular In Vitro**.2017. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, 2017.

DESTEFANIS, M. et al. Extremely low frequency electromagnetic fields affect proliferation and mitochondrial activity of human cancer cell lines. **International Journal of Radiation Biology**, v. 91, n. 12, p. 964–972, 2 dez. 2015.

FINI, M. et al. The effect of pulsed electromagnetic fields on the osteointegration of hydroxyapatite implants in cancellous bone: a morphologic and microstructural in vivo study. **Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 20, n. 4, p. 756–763, jul. 2002.

HARRISON, Rose G. et al. Observations of the living developing nerve fiber. **The Anatomical Record**, v. 1, n. 5, p.116-128, 1 jun. 1907. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ar.1090010503>>. Acesso em: 15 jun. 2018.

HERNÁNDEZ-BULE, M. L. et al. Electric stimulation at 448 kHz promotes proliferation of human mesenchymal stem cells. **Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology**, v. 34, n. 5, p. 1741–1755, 2014.

INSTITUTO DE PESQUISAS COM CÉLULAS-TRONCO (IPCT). **Células-tronco**. 2013. Disponível em: <<http://celulastroncors.org.br/celulas-tronco-2/>>. Acesso em: 17 jun. 2018.

SILVA, Domiciano Correa Marques da. **Campo magnético**. 2017. Disponível em: <<https://mundoeducacao.bol.uol.com.br/fisica/campo-magnetico.htm>>. Acesso em: 17 jun. 2018.

KHAN, F. A. The Immortal Life of Henrietta Lacks. **The Journal of IMA**, v. 43, n. 2, p. 93–94, jul. 2011.

KISTNER, O. Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. **Vaccine**, v. 16, n. 9–10, p. 960–968, maio 1998.

KRUEGER-BECK, E. et al. Campos elétricos e magnéticos aplicados à regeneração nervosa periférica. **Revista Neurociências**, v. 18, n. ip, p. 1–13, 5 ago. 2010.

LANCE - LABORATÓRIO NACIONAL DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS. **Lance**. Disponível em: <<http://biologia.ib.usp.br/lance/>>. Acesso em: 11 abr. 2018.

LUZ, Antônio Máximo Ribeiro da; ÁLVARES, Beatriz Alvarenga. **Curso de Física**. Minas Gerais: Scipione, 2010. v. 3.

MAREĐZIAK, M. et al. The influence of static magnetic fields on canine and equine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal**, v. 50, n. 6, p. 562–571, 2014.

MAREĐZIAK, M. et al. Static magnetic field enhances the viability and proliferation rate of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells potentially through activation of the phosphoinositide 3-kinase/Akt (PI3K/Akt) pathway. **Electromagnetic Biology and Medicine**, v. 36, n. 1, p. 45–54, 2017.

MEDEIROS, Helouise Richardt. **Efeito da Estimulação Magnética Estática em Linhagem Celular de Neuroblastoma e Neuroblastoma Diferenciado**. 2017. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

MIANA, V. V.; GONZÁLEZ, E. A. P. Adipose tissue stem cells in regenerative medicine. **oncancermedicalscience**, v. 12, 28 mar. 2018.

NARDI, Nance Beyer. **Células-tronco Mesenquimais e Engenharia de Tecidos**. Porto Alegre: Laboratório de Células-tronco e Terapia Gênica, 2010.

NOOHI, S.; AMIRSALARI, S. History, Studies and Specific Uses of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) in Treating Epilepsy. **Iranian Journal of Child Neurology**, v. 10, n. 1, p. 8, 2016.

O'REARDON, J. P. et al. Efficacy and Safety of Transcranial Magnetic Stimulation in the Acute Treatment of Major Depression: A Multisite Randomized Controlled Trial. **Biological Psychiatry**, v. 62, n. 11, p. 1208–1216, dez. 2007.

PAUN, I. et al. 3D Biomimetic Magnetic Structures for Static Magnetic Field Stimulation of Osteogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 495, 7 fev. 2018.

ROSEN, A. D. Membrane response to static magnetic fields: effect of exposure duration. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1148, n. 2, p. 317–320, 5 jun. 1993.

ROSEN, A. D. Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 39, n. 2, p. 163–173, 1 out. 2003.

ROUX W. Beiträge zur Entwicklungsmechanik des Embryo: I. Einleitung. **Z Biol** 21:411– 524, 1885.

SORDELLI. **Stem cells**. 2017. Disponível em: <<http://nievo2015.altervista.org/stem-cells-2/>>. Acesso em: 17 jun. 2018.

URANIO, M. F. et al. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: A comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 5, p. 361–373, 2011.

VIDOR, Silvana Bellini. **Células-Tronco Mesenquimais de Origem Adiposa Associadas a Enxertos Livres de Pele de Espessura Total em Modelo Murino**. 2015. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

WAGERS, A. J.; CHRISTENSEN, J. L.; WEISSMAN, I. L. Cell fate determination from stem cells. **Gene Therapy**, v. 9, n. 10, p. 606–612, maio 2002.

WANG, Z. et al. Moderate strength (0.23–0.28 T) static magnetic fields (SMF) modulate signaling and differentiation in human embryonic cells. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 356, 2009.

YUN, H.-M. et al. Magnetic nanocomposite scaffolds combined with static magnetic field in the stimulation of osteoblastic differentiation and bone formation. **Biomaterials**, v. 85, p. 88–98, abr. 2016.

ZAGO, Marco Antonio; COVAS, Dimas Tadeu. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006.

ZANNELLA, S. **Biological effects of magnetic fields**. 1998. Disponível em: <<https://cds.cern.ch/record/1246526/files/p375.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2018.

ZHANG, L. et al. Cell type- and density-dependent effect of 1 T static magnetic field on cell proliferation. **Oncotarget**, v. 8, n. 8, 21 fev. 2017.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA “*IN VITRO CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY – ANIMAL*”

Instructions for Authors IVA

In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal (In Vitro Animal) is a journal of the Society for In Vitro Biology (SIVB). Original manuscripts reporting results of research in cellular, molecular, and developmental biology that employ or are relevant to organs, tissue, tumors, and cells in vitro will be considered for publication. The scope of the journal is embodied in the following matrix:

- Biotechnology
- Cell and Tissue Models
- Cell Growth/Differentiation/Apoptosis
- Cellular Pathology/Virology
- Cytokines/Growth Factors/Adhesion Factors
- Establishment of Cell Lines
- Product Applications
- Signal Transduction
- Stem Cells
- Toxicology/Chemical Carcinogenesis

CELL LINE AUTHENTICATION

To encourage the highest level of quality and accuracy in research submitted to the journal, In Vitro– Animal has put into effect a requirement for a statement to be included in all papers submitted to our journal beginning on January 1, 2009. This statement, which should be included in the Materials and Methods section of full articles and with the listing of materials in Reports, must include the following: Authors must state:

1. Whether you have tested and authenticated the cell lines utilized in the research
2. List the method by which the cells were tested
3. List when the cells were last tested and where, or
4. State when the cells were obtained from a cell bank

All papers that do not include this information could have their manuscript returned with the requested revision to include this information. If you have not tested your cells for authentication, the paper might not be accepted. To access a database that lists cell lines that are currently known to be cross-contaminated or otherwise misidentified, please visit: <http://iclac.org/databases/cross-contaminations/>. Re-authentication is not required for serially passaged cells obtained directly from an internationally recognized cell bank that performs cell line characterizations or from a characterized Master Cell Bank and proliferated in the users laboratory for less than 6 months after receipt or reconstitution.

MANUSCRIPT SUBMISSION REQUIREMENTS

When submitting a manuscript for consideration, authors should select the matrix heading, which best covers the scope of their manuscript. The journal publishes three types of manuscripts:

Reports, Articles, Letters to the Editor, and Invited Reviews. Reports (formerly Scientific Letters to the Editor) are usually limited to three printed pages and no more than three illustrations that contain especially timely results that are of special interest to readers before development into a complete study. The Report format is particularly suited for characterizations of new cell lines, tools, techniques, and methods that do not justify a full Article. Reports receive expedited peer review and are subject to additional editorial review prior to final publication to comply with the Report format.

Articles are not restricted in length. Letters to the Editor (formerly nonscientific Letters to the Editor) concerning a wide range of issues of interest to readers, including controversial opinions, quality control of cell cultures, etc., are welcomed and are subject to editorial or peer review. Unsolicited Reviews on relevant topics will be considered; however, it is recommended that authors contact the Editor prior to preparation. Both unsolicited and Invited Reviews are subject to rigorous editorial review, often in consultation with multiple experts in the field.

CHANGES TO AUTHORS

Author changes are not allowed after submission. Authors can be added at resubmission only when additional experiments are requested. No author changes are allowed after acceptance.

ETHICAL COMPLIANCE

DISCLOSURE STATEMENTS

Disclosure statements are required for each author to be included within the manuscript text. Each statement must include the author's name and declare the conflict of interest, or "no conflict of interest". All potential benefits in any form from a commercial party related directly or indirectly to the subject of the manuscript or any of the authors must be acknowledged. For each source of funds, both the funding organization (written in full) and the grant number should be given. Please note that the manuscript will be returned to the corresponding author if the disclosure statement for each author is not included in the manuscript text. Details provided in the disclosure statement must correspond with the information provided in the Conflict of Interest forms uploaded during submission.

CONFLICT OF INTEREST FORMS WITH SUBMISSION. As part of the submission process you must upload a completed and signed ICMJE disclosure form for each author. Manuscripts submitted without all forms will be returned for corrections. Blank ICMJE forms are available for download at <http://www.icmje.org/>.

EXPERIMENTAL SUBJECTS/ANIMALS

All authors are expected to abide by accepted ethical standards. In investigations that involve human subjects or laboratory animals, authors should provide an explicit statement in Materials and Methods that the experimental protocols were approved by the appropriate institutional review committee and meet the guidelines of their responsible governmental agency. In the case of human subjects, informed consent is essential.

CONSENSUS STATEMENT ON SUBMISSION AND PUBLICATION OF MANUSCRIPTS

Increasing problems of duplicate and fraudulent submissions and publications have prompted the editors of *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* to support the following overall principles of publication. While not intended as an all-inclusive document, these examples and guidelines should alert authors to potential problems that should be avoided when they are considering submission of a manuscript to a peer-reviewed journal. This consensus statement is intended as a basic guide for authors. In the interest of promoting the highest ethics in scientific publishing, we ask that authors take these criteria into careful consideration when submitting a manuscript to a peer-reviewed scientific journal.

DUPLICATE SUBMISSION AND PUBLICATION

In general, if a manuscript has been peer-reviewed and published, any publication is duplication. Exceptions to this general rule may be:

a) Prior publications in meeting program abstract booklets or expanded abstracts. However, these must be referenced in the final manuscript.

b) A manuscript which extends an original database (a good rule might be expansion by 50% or more) or which analyzes the original database in a different way in order to prove or disprove a different hypothesis. Previous manuscripts reporting the original database must, however, be referenced.

c) Manuscripts that have been published originally in non-English language journals, provided that the prior publication is clearly indicated on the English language submission and referenced in the manuscript. In some circumstances, permission to publish from the non-English language journal may be required.

For example, any submission duplicating material previously published in full in "Proceedings" or book chapters is considered duplicate unless the exceptions in (a) above apply. Similarly, manuscripts dealing with subgroups of data that have previously been analyzed, discussed and published as a larger group are considered duplicate unless (b) above applies.

The Internet raises special concerns. If data have previously appeared on the Internet, submission of those data for publication is considered duplication. If Internet publication follows journal publication, the journal publication should be clearly referenced. Some journals may provide early Internet publication of accepted peer reviewed papers which are subsequently published in that journal. This does not constitute duplication if both manuscripts are identical and covered by the same single copyright.

FRAUDULENT PUBLICATION

The following activities are examples of fraudulent publication practices:

- Willful and knowing submissions of false data for publication.
- Submission of data from sources not the author's (or authors') own.
- Falsely certifying that the submitted work is original and has not been submitted to, or accepted by, another journal.
- Sponsoring or vouching for a manuscript containing data over which the sponsor has no control or knowledge.
- Allowing one's name to appear as an author without having contributed significantly to the study.

- Adding an author's name to a manuscript to which he/ she has not contributed, or reviewed or agreed to in its current form.
- Flagrant omission of reference to the work of other investigators which established their priority.
- Falsification of any item on the copyright form.
- Failure to disclose potential conflict of interest with a sponsoring agency.

AUTHORSHIP

In the majority of research studies submitted to journals for possible publication, many individuals participate in the conception, execution, and documentation of each of those works. However, recognition of work in the form of authorship has varied widely. This consensus statement is being issued to clarify and define the criteria for journal authorship. The following guidelines should be used to identify individuals whose work qualifies them as authors as distinct from those who are contributors to the work under consideration. All persons designated as authors should qualify for authorship, and all those who qualify should be so credited.

CRITERIA FOR AUTHORSHIP

Individuals claiming authorship should meet all of the following 3 conditions:

- 1) Authors make substantial contributions to conception and design, and/or acquisition of data, and/or analysis and interpretation of data;
- 2) Authors participate in drafting the article or revising it critically for important intellectual content;
- 3) Authors give final approval of the version to be submitted and any revised version to be published.

Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Allowing one's name to appear as an author without having contributed significantly to the study or adding the name of an individual who has not contributed or who has not agreed to the work in its current form is considered a breach of appropriate authorship. Acquisition of funding, collection of data, contributing cases, or general supervision of the research group, of itself, or just being the Chair of the department does not justify authorship if the above criteria are not fulfilled.

ORDER OF AUTHORS

The order of authorship on the byline should be a joint decision of the co-authors.

MULTI-CENTER STUDIES

When a large, multi-center group has conducted the work, the group should identify the individuals who accept direct responsibility for the manuscript. These individuals should fully meet the criteria for authorship defined above and editors will ask these individuals to complete journal-specific author and conflict of interest disclosure forms. When submitting a group-author manuscript, the corresponding author should clearly indicate the preferred citation and should clearly identify all individual authors as well as the group name.

CONTRIBUTORS LISTED IN ACKNOWLEDGMENTS

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgments section. Examples of those who might be acknowledged include: a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department Chair who provided only general support. Financial and material support should also be acknowledged. Because readers may infer their endorsement of the data and conclusions, all persons listed as contributors must give written permission to be acknowledged.

ONLINE SUBMISSION

We are pleased to announce that we have moved to an online system of manuscript tracking called Editorial Manager. Authors are encouraged to submit their articles to In Vitro Animal ONLINE. This will allow even quicker and more efficient processing of your manuscript. A wide range of submission file formats is supported, including: Word, RTF, TIFF, GIF, JPEG, EPS, Excel and PowerPoint. PDF is not an acceptable file format.

SUBMIT ONLINE

(<http://www.editorialmanager.com/ivan/>)

To submit papers on plant related materials, please visit:
(<http://www.editorialmanager.com/ivpl/>)

MANUSCRIPT PREPARATION

Manuscripts are to be submitted in their final form. Papers must be written in English, and authors are urged to aim for clarity, brevity, and accuracy of information and language. Authors whose first language is not English should have their papers checked for linguistic accuracy by a native English speaker.

Submitted manuscripts should conform to the following format and sequence. The Report format is similar to that for Articles and Reviews described below, except that the body

of the text is not divided into sections or subheadings. Methods are integrated into the text or legend to figures and Results and Discussion are combined.

Type double-spaced, and order the elements comprising the manuscript as follows:

- Title Page
- Summary
- Key Words
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Conclusions
- Appendix
- Acknowledgements
- References
- Tables
- Figure Legends
- Figures

TITLE PAGE: The title page should include

- the title of the article
- author(s)' name(s) and affiliation(s) (the department and institution from which the work originated)
- complete mailing address of the one author who will review the proofs
- and suggested running head (not to exceed 40 characters, including spaces)

Note that the affiliation should be a footnote to the author's name.

ABSTRACT: An abstract is to be provided, preferably no longer than 250 words. Do not use abbreviations, footnotes, or references in the abstract.

KEY WORDS: A list of 4–5 key words is to be provided directly below the abstract. Key words should express the precise content of the manuscript, as they are used for indexing purposes.

ACKNOWLEDGMENTS: All acknowledgments (including those for grant and financial support) should be typed in one separate paragraph that directly precedes the references section.

REFERENCES

Literature citations in the text should indicate the author's surname with the year of publication in parentheses, e.g. Carlin (1992); Brooks and Carlin (1992). If there are more than two authors, only the first should be named, followed by "et al."

References at the end of the paper should be listed in alphabetical order by the first author's name. If there is more than one work by the same author or team of authors in the same year, a, b, etc. is added to the year both in the text and in the list of references.

JOURNAL PAPERS:

name(s) and initial(s) of all authors; year; full title; journal title abbreviated in accordance with international practice; volume number; first and last page numbers

Example: Nakashima K, Yamada L, Satou Y, Azuma J, Satoh N (2004) The evolutionary origin of animal cellulose synthase. *Dev Genes Evl* 214: 81–88.

SINGLE CONTRIBUTIONS IN A BOOK:

name(s) and initial(s) of all authors; year; title of article; editor(s); title of book; edition; volume number; publisher; place of publication; page numbers

Example: Sanger JW (1977) Nontubulin molecules in the spindle. In: Little M, Paweletz N, Petzelt C, Ponstingl H, Schroeter D, Zimmermann H-P (eds) *Mitosis facts and questions*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 98–113

BOOK:

name and initial(s) of all authors; year; title; publisher; place of publication

Example: Hall BK (1999) *The Neural Crest in Development and Evolution*. Springer, Berlin Heidelberg New York

AGENCY PUBLICATION:

Council of biology editors style manual. CBE style manual committee. 5th ed. Bethesda, MD: Council of Biology Editors; 1983

WEB PAGES:

1. Article by DOI (with page numbers): Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* 78:74–80. doi: 10.1007/s001090000086
2. Article by DOI (before issue publication with page numbers): Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* (in press). doi: 10.1007/s001090000086
3. Article in electronic journal by DOI (no paginated version): Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med*. doi: 10.1007/s801090000086
4. Online document: Doe J (1999) Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Cited 15 Jan 1999
5. Online database: Healthwise Knowledgebase (1998) US Pharmacopeia, Rockville. <http://www.healthwise.org>. Cited 21 Sept 1998
6. Supplementary material/private homepage: Doe J (2000) Title of supplementary material. <http://www.privatehomepage.com>. Cited 22 Feb 2000
7. University site: Doe J (1999) Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html>. Cited 25 Dec 1999
8. FTP site Doe J (1999) Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt>. Cited 12 Nov 1999
9. Organization site: ISSN International Centre (1999) Global ISSN database. <http://www.issn.org>. Cited 20 Feb 2000

Unpublished results may be cited in the text as personal communications. However, in this case the final version of the manuscript must be accompanied by a note of consent signed by each author quoted.

REFERENCES: CELL LINE AND REAGENT DATA

The source of cells utilized, species, sex, strain, race, age of donor, and whether primary or established should be clearly indicated. The name, city, and state or country of the source of reagents should be stated within parentheses when first cited. Specific tests used for verification of cell lines and novel reagents should be identified. Specific tests for the presence of mycoplasmal contamination of cell lines are recommended. If these tests were not performed, this fact should be clearly stated. Other data relating to unique

biological, biochemical, and/or immunological markers should also be included if available. Publication of results in *In Vitro Animal* is based on the principle that results must be verifiable. Authors are expected to make unique reagents available to qualified investigators. Authors deriving or using cell lines are encouraged to follow the UKCCCR Guidelines for the Use of Cell Lines in Cancer Research in respect to validation of identity and infection-free cultures.

NOMENCLATURE

The recommendations of the Society for In Vitro Biology Committee on Terminology should be followed. Schaeffer, W. I. Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26:97–101; 1990.

TABLES AND FIGURES

TABLES: Each table should be numbered consecutively with Arabic numerals. Footnotes to tables should be indicated by lower-case superscript letters. If you use data from another published or unpublished source, obtain permission and acknowledge fully.

LEGENDS: Legends must be brief, self-sufficient explanations of the figures and tables in no more than four or five lines. Remarks such as “For explanation, see text” should be avoided. The legends should be typed double-spaced and grouped together on a separate page. When symbols, arrows, numbers or letters are used to identify parts of the illustration, identify and explain each one clearly.

FIGURES: Figures should be limited to those essential for the text. The same results should be presented as either the graph or tables, not as both. Color may be used without charge for the electronic edition of the journal if files are supplied but will appear in the printed version at the author’s expense: \$534 per article (+VAT).

NOTE: If you wish your figures to be placed in the print edition in color, you must specifically list this request. Once the paper is accepted, you will need to contact the publisher directly to arrange payment at raymond.ramonas@springer.com

ALL FIGURES, whether photographs, graphs, or diagrams, should be numbered consecutively. If figures are created electronically please see Guidelines for Electronically Produced Figures for Print. Line drawings should be supplied as clear black and white drawings suitable for reproduction. All lines should be of uniform thickness. Letters and numbers should be of professional quality and proper dimensions. All figures submitted should allow for high quality reproduction at a same size permitting direct printing (with no

reduction) usually 12.7 by 17.3 cm (5 by 7 inches) but no larger than 20.3 by 25.4 cm (8 by 10 inches). The publisher reserves the right to reduce figures. Micrographs have an internal magnification marker; the magnification should also be stated in the legend. If photographs of persons are used, either the subjects must not be identifiable or their pictures must be accompanied by written permission to use the photograph. Please note that Publisher cannot return original art to authors.

Guidelines for Electronically Produced Illustrations for

Print GENERAL

- Send figures separately from the text (i.e. files should not be integrated with text files).
- Vector graphics exported from a drawing program should be stored in EPS format.
- Suitable drawing program: Adobe Illustrator. For simple line art the following drawing programs are also acceptable: Corel Draw, Freehand, Canvas.
- No rules narrower than .25 pt.
- No gray screens paler than 15% or darker than 60%.
- Screens meant to be differentiated from one another must differ by at least 15%.

HALFTONE FIGURES

- Black & white and color figures should be saved in TIFF and EPS formats.
- Figures should be created using Adobe Photoshop whenever possible.

SCANS

- Scanned reproductions of black and white photographs should be provided as 300 ppi TIFF files.
- Scanned color figures should be provided as TIFF files scanned at the minimum of 300 ppi with a 24-bit color depth.
- Line art should be provided as TIFF files at 600 ppi.
- We do prefer having the original art as our printers have drum scanners, which allow for better reproduction of critical medical halftones.

GRAPHICS QUALITY

If you are submitting electronic graphics that you have scanned, be prepared to send the hard copy originals upon request. While the electronic files you have created are satisfactory for the review process, they may not be of sufficient quality for printing. This also holds true for files created in low-resolution graphics environments such as MS Powerpoint, etc.

GRAPHICS FROM VIDEOS

- Separate files should be prepared for the frames from a video that are to be printed in the journal. When preparing these files you should follow the same rules as listed under Halftone Figures.

MULTIMEDIA ARTICLE AND DYNAMIC MANUSCRIPT SUBMISSION A

REQUIREMENTS (I.E. STREAMING VIDEOS)

Multimedia articles are papers where the heart of the article is the video and, generally, only an abstract and references are included. Dynamic articles are regular articles with video(s) included as electronic supplementary material.

Upon submission of multimedia or dynamic articles, the author(s) will be required to submit the video in the following format:

- For multimedia articles, video clips should not exceed 9 minutes. For dynamic articles, video clips should not exceed 3 minutes and each manuscript should not contain more than 3 video clips.
- Multimedia file for review and submission: MPEG-1 file with the largest frame size (usually 320 x 240 pixels) that will fit on a CD and will be playable on a Windows-based computer.
- The content of these files must be identical to that reviewed and accepted by the editors of the In Vitro Plant and Animal Journals.
- All narration should be in English.
- There should be a “manuscript” submitted with the video that includes a title page, abstract and key words, as well as references if needed.

DYNAMIC MANUSCRIPT:

A dynamic manuscript is a print article with imbedded video material. Up to 3 (one minute maximum each) videos per manuscript submission will be accepted.

Make sure to note in your manuscript the placement of the video clips. All standard instructions for manuscript and video submission should be followed for a dynamic manuscript submission.

SPRINGER OPEN CHOICE

In addition to the traditional publication process, Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice (Springer's open access model). A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular article, but in addition is made freely available through Springer's online platform SpringerLink. If you wish to publish via Springer Open Choice, you will have the opportunity to make this request after your paper enters production. At such time an e-mail will be sent to authors asking them to select an option for Springer Open Choice.

COPYRIGHT

To maintain and protect the Society's ownership and rights and to protect the original authors from misappropriations of their work, SIVB requires the corresponding author to sign a copyright transfer agreement on behalf of all of the authors. Unless this agreement is executed (without changes or addenda) and received by the Editorial Office, SIVB will not publish the manuscript either online or in print. For online submissions, this form will be sent to you electronically upon submission of your manuscript. Once signed, it can either be faxed, e-mailed as a pdf or directly mailed to: Michele Schultz, Publications Manager, Society for In Vitro Biology, 514 Daniels St., Suite 411, Raleigh, NC 27605, USA, (Fax: (910)755-5432) (e-mail: sivb@sivb.org).

If ALL authors were employed by the US government when the work was performed, the corresponding author should not sign the copyright transfer agreement, but should instead attach to the agreement a statement attesting that the manuscript was prepared as part of their official duties and, as such, is a work of the US government not subject to copyright.

If SOME of the authors were employed by the US government when the work was performed but others were not, the corresponding author should sign the copyright transfer agreement as it applies to that portion performed by the non-governmental employee authors.

Upon submitting an article to *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal* for review and possible publication, authors are requested to add the following notice for the first screen of any posted electronic preprint versions of the paper. "This work has been submitted to the Society for In Vitro Biology for possible publication in *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal*. Copyright may be transferred without notice, after which this version may no longer be accessible."

When the work has been accepted for publication, the author may post it, in its final accepted form, on their personal server or on their institution's server (but not on any organized preprint server) with a notice: "Accepted for publication in *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal* as of (date), until it is published by the Society in print or electronic form."

After publication, authors may post their Society copyrighted material on their own server or on their institutions server without permission, provided that it includes the following notice: "This material has been published in (name of journal, issue number and date, page numbers), the only accredited archive of the content that has been certified and accepted after peer review. Copyright and all rights therein are retained by the Society for In Vitro Biology. This material may not be copied or e-posted without explicit permission of the copyright owner." Please provide a link to the reproduction page of the SIVB website with the following text: For more information about Reproduction Permission for this article, please visit the SIVB website at www.sivb.org/pubs_reproductionPermission.asp."



<http://www.springer.com/journal/11626>

In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal
Editor-in-Chief: Okamoto, T.
ISSN: 1071-2690 (print version)
ISSN: 1543-706X (electronic version)
Journal no. 11626