UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

DAVID LUCAS DESIDÉRIO

**Efeito de campos magnéticos estáticos e compensados na
proliferação celular in vitro**

BAURU
2017

DAVID LUCAS DESIDÉRIO

**Efeito de campos magnéticos estáticos e compensados na
proliferação celular in vitro**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral.

Orientador: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Co-Orientador: Prof. Dr. André Luiz Malvezzi

Processo FAPESP: 2013/24038-7

Versão Corrigida

BAURU

2017

D46e Desidério, David L.
Efeito de campos magnéticos estáticos e compensados na proliferação celular in vitro / David Lucas Desidério. – Bauru, 2017.
93 p.: il.; 31 cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Co-Orientador: Prof. Dr. André Luiz Malvezzi

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº:
Data:

(Cole a cópia de sua folha de aprovação aqui)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Hernani Guimarães Andrade, pesquisador do desconhecido no século XX.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos orientadores da minha trajetória acadêmica e a possibilidade e liberdade que me deram de entrar em contato com diversas áreas do conhecimento. Notadamente aos Professores Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf, e Prof. Dr. André Luiz Malvezzi que abriram as portas de novos campos de estudo, para meu aprendizado. Do mesmo modo agradeço a todos os professores que participaram da banca do exame de qualificação, bem como a todos que aceitaram compor a banca de defesa da tese.

Agradeço imensamente a todos os colaboradores, alunos e colegas que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma com a realização deste trabalho. Também agradeço a todos os meus familiares pelo apoio e compreensão neste período.

Também agradeço a todos os meus familiares pelo apoio e compreensão neste período.

Agradeço igualmente às agências de fomento que viabilizaram esta pesquisa, inicialmente a CAPES, pelo período de 9 meses, e posteriormente, até a conclusão deste trabalho, a FAPESP, sob o número do processo: 2013/24038-7.

A todos, Gratidão!

"Mas custou algum sacrifício, alguma renúncia, algum dissabor a reviravolta nos conceitos que imperavam até então, pois os homens se apegam muito às suas doutrinas, às suas convicções. Não é fácil desarraigar crenças e concepções, ainda que provemos à saciedade sua inconsistência."

Hernani Guimarães Andrade

(ANDRADE, 2007, p. 48)

RESUMO

Inserido no paradigma da transdisciplinaridade, o presente trabalho foi desenvolvido em etapas, com os seguintes objetivos: a) Construir um dispositivo com base de metal não magnético para ímãs permanentes, visando à geração de um Campo Magnético Estático (CME) ou de um Campo Magnético Compensado (CMC); b) Expor culturas de células mesenquimais a um CME e a um CMC, ou a nenhum campo (controle); c) Analisar a influência destes campos na viabilidade e proliferação celular e nos casos em que houve alteração em pelo menos um destes parâmetros, utilizar a análise proteômica como ferramenta para a compreensão dos mecanismos envolvidos. O dispositivo foi construído utilizando aço inoxidável, capaz de gerar dois tipos de Campos Magnéticos: Compensado (CMC) com intensidade de aproximadamente 0 mT e Estático (CME) com intensidade média de 165 mT. Estes campos foram aplicados a culturas de células mesenquimais de medula óssea de camundongos AJ (MSC/AJ), nos períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 h (CMC) e 24 h (CME). Os efeitos sobre a proliferação e a viabilidade foram avaliados por método de contagem manual de células com marcação por azul de tripan. A análise proteômica foi realizada para os experimentos com CMC, com o objetivo de descrever as proteínas envolvidas nas alterações encontradas. A exposição ao CMC tendeu a reduzir a proliferação das células de medula óssea MSC/AJ em relação ao controle em 96 h, porém sem diferença significativa, o que poderia estar relacionado a proteínas que inibem a transcrição, como a *Forkhead box protein P2 – Foxp2*. Este mesmo campo aumentou a viabilidade celular em relação ao baseline para todos os tempos experimentais, o que poderia estar relacionado a proteínas relacionadas à ligação ao Ca^{+2} . Esses mecanismos, entretanto, precisam ser estudados mais profundamente para que possam ser comprovados ou não. Já a exposição ao CME levou a uma tendência à diminuição da proliferação e viabilidade celular em relação ao grupo controle, embora sem diferenças significativas, provavelmente por conta do tamanho amostral e tempo de avaliação (24 h).

Palavras-chave: Campos Magnéticos. Proliferação de Células. Proteômica.

ABSTRACT

Proteomics of the effect of compensated and static magnetic fields on cell proliferation in vitro

Inserted in the transdisciplinarity paradigm, the present work was developed by steps with the following aims: a) To build a device of non-magnetic metal to hold permanent magnets for the generation of a Static Magnetic Field (SMF) or a Compensated Magnetic Field (CMF); b) To expose mesenchimal cells to the SMF and to CMF or to none of the fields (control); c) To analyze the influence of these fields on cell viability and cell proliferation and in the case where it occurred alteration in at least one of these parameters, to use proteomics as a tool for the comprehension of the involved mechanisms. The device was built in stainless steel, able to generate two kinds of Magnetic Fields: Compesated (CMF) with an intensity of nearly zero mT and Static (SMF) with a mean intensity of 165 mT. These fields were applied to bone marrow mesenchimal cell cultures from AJ mice (MSC/AJ), for 0, 24, 48, 72 and 96 h (CMF) and 24 h (SMF) periods. The effects on the proliferation and viability were assessed by tripan blue dying and manual counting of the cells. Proteomics was done for the experiments with CMF, aiming to describe the involved proteins on found alterations. The exposition to CMF tends to reduce the bone marrow cell proliferation of MSC/AJ in relation to control in 96 h, but with no significant difference, which may be related to proteins that inhibit the transcription, like *Forkhead box protein P2 – Foxp2*. This very field raised the cell viability in relation to the baseline for all the experimental times that could be related to proteins connected to Ca^{2+} binding. However, these mechanisms need more experiments, so they can be confirmed or not. The exposition to the SMF tends to decrease both cell proliferation and viability in relation to the control group, although with no significant difference, probably because of the sample number and the exposition time (24h).

Key words: Magnetic Fields. Cell Proliferation. Proteomics.

LISTA DE SIGLAS

1C	1 Controle
2D	Duas Dimensões
2T	2 Tratamento
3D	Três Dimensões
AC	Alternate Current
ALP	Alkaline Phosphatase
AMBIC	Bicarbonato de Amônio
ASC	Adipose Stromal Cell
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein-2
BMSC	Bone Marrow Stem Cell
CCC	Câmara de Campos Compensados
CCM	Compensador de Campos Magnéticos
CEM	Campo Eletromagnético
CM	Campo Magnético
CMBF	Campos Magnéticos sinusoidais de Baixa Frequência
CMC	Campo Magnético Compensado
CME	Campo Magnético Estático
CSC	Cardiac Stem Cell
DC	Direct Current
DGCMEC	Dispositivo Gerador de Campos Magnéticos Estático e Compensado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPSC	Dental Pulp Stem Cell
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
IAA	Iodoacetamida
IBSP	Bone Sialoprotein
ICNIRP	International Committee on Non Ionization Radiation Protection
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
KDR	Kinase Domain Receptor
LFMF	Low Frequency Magnetic Fields
LT	Linhas de Transmissão
MEM	Minimum Essential Medium
MHC	Myosin heavy chain
MMP	Matrix Metalloproteinase
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MSC	Mesenchymal Stem Cell
N	Norte
NeFeB	Neodímio, Ferro e Boro
OC	Osteocalcin
OMS	Organização Mundial da Saúde
OP	Osteopontin
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction

PLGS	ProteinLynx GlobalServer
ROS	Reactive Oxygen Species
RPM	Rotações por Minuto
S	Sul
SFB	Soro Fetal Bovino
SMA	Smooth muscle actin
TDP	Tempo de duplicação da população
TFA	Trifluoroacético
TGF	Transformation Growth Factor
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UniProt	Universal Protein Resource
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Sumário

1.	Introdução	9
2.	Revisão de Literatura	15
2.1.	Células tronco	15
2.1.1.	Células tronco totipotentes	15
2.1.2.	Células tronco pluripotentes	15
2.1.3.	Células tronco multipotentes	15
2.1.4.	Células tronco de pluripotência induzida	15
2.2.	Exposição de meios biológicos a campos magnéticos.....	16
2.3.	Estado da Arte	20
2.4.	Análise Proteômica	23
3.	Proposição	27
3.1.	Objetivo geral	27
3.2.	Objetivos específicos	27
4.	Material e métodos	31
4.1.	Design experimental para o dispositivo “Compensador de Campos Magnéticos”	31
4.2.	Preparo dos poços (placas de Petri)	33
4.3.	Construção do “Compensador de Campos Magnéticos” – Protótipo	34
4.4.	Banco de células	35
4.5.	Experimentos exploratórios	35
4.6.	Medição da intensidade dos campos magnéticos	39
4.7.	Simulações magnéticas para o Campo Magnético Compensado:	42
4.8.	Simulações magnéticas para o Campo Magnético Estático:	45
4.9.	Protocolos utilizados nos experimentos com as células-tronco.....	49
4.9.1.	Contagem celular manual com marcação por azul de Tripan - Plaqueamento: ..	49
4.9.1.1.	Tripsinização:	49
4.9.1.2.	Contagem celular inicial:	49
4.9.1.3.	Cálculo da taxa de Viabilidade celular:.....	50
4.9.1.4.	Plaqueamento:	51
4.9.1.5.	Contagem Tempo 0 (T0):.....	51
4.9.2.	Contagem celular manual com marcação por azul de Tripan - Coleta:.....	52
4.9.3.	Ensaio de proliferação celular para Análise Proteômica - Plaqueamento	52
4.9.4.	Ensaio de proliferação celular para Análise Proteômica - Coleta	53
4.9.5.	Avaliação proteômica do lisado celular.....	53
4.9.6.	Análise por nanoUPLC acoplado a espectrometria de massas.....	54
4.9.7.	Quantificação livre de marcadores (“ <i>label-free</i> ”)	55
4.9.8.	Análise Estatística	55
5.	Resultados e Discussão:	59
5.1.	Construção do dispositivo para geração de CMC e CME	59
5.2.	Contagem celular manual com marcação por azul de Tripan - CMC	59
5.3.	Contagem celular manual com marcação por azul de Tripan: - CME.....	66
5.4.	Análise proteômica	72
5.4.1.	Campo magnético compensado	72
6.	Conclusões.....	83
	Referências	87

1 INTRODUÇÃO

1. Introdução

A presente pesquisa é permeada pela Transdisciplinaridade, tendo disciplinas envolvidas das grandes áreas das Ciências Exatas como a Física, Química, Engenharia e Tecnologia; das Ciências Biológicas e da Saúde como a Biologia, a Bioquímica, a Biofísica, a Odontologia e a Medicina; e das Ciências Humanas e Sociais Aplicadas, como o *Design*.

Na década de 1970, o conceito de Transdisciplinaridade foi criado por Jean Piaget, Erich Jantsch e André Lichnerowics em um evento internacional sobre os problemas no ensino e na pesquisa nas Universidades, ocorrido na França. Posteriormente foi desenvolvido por Edgar Morin, Basarab Nicolescu, Pierre Weil, Roberto Crema e Ubiratan D'Ambrosio, entre outros, que contribuíram tanto com a abrangência do conceito quanto em sua profundidade, aplicabilidade e disseminação nos meios acadêmicos (NICOLESCU, 2008; MORIN, 2003; D'AMBROSIO, 2001; WEIL; D'AMBROSIO; CREMA, 1993). Em 1985, Basarab Nicolescu (2008) incluiu o sentido de ir “além das disciplinas”, ampliando o conceito:

A transdisciplinaridade, como o prefixo ‘trans’ indica, diz respeito àquilo que está ao mesmo tempo entre as disciplinas, através das diferentes disciplinas e além de qualquer disciplina. Seu objetivo é a compreensão do mundo presente, para o qual um dos imperativos é a unidade do conhecimento.

Este trabalho, por tocar nestas diferentes áreas do conhecimento acima citadas e fazê-las interagir de forma dinâmica, unificando e transcendendo as barreiras disciplinares de modo a constituir um conhecimento novo, pode ser inserido no paradigma proposto pela Transdisciplinaridade, podendo, por consequência, contribuir igualmente com as disciplinas pelas quais transpassa.

A título de histórico, desde a Antiguidade, o magnetismo é conhecido, como a propriedade de produzir um campo capaz de atrair objetos de ferro, a partir do minério “magnetita”, que constitui um ímã natural (HEWITT, 2008; BONJORN, et al., 1993).

Michael Faraday, no século XIX, estudou a influência dos campos magnéticos sobre as várias substâncias, classificando dois tipos de materiais, com relação às suas reações a estes campos. As substâncias “diamagnéticas” que são repelidas pelo campo magnético, como o bismuto, ouro, chumbo, antimônio, cobre, mercúrio, carbono, gases raros, hidrogênio, álcool etílico e água. E as substâncias “paramagnéticas” que são atraídas pelo campo magnético, como o ar, oxigênio, e quase todos os metais, sendo estes, “ferromagnéticos” como o ferro, o níquel o cobalto e outras ligas metálicas.

Ainda na primeira metade do século XIX, Hans Christian Oersted, Michael Faraday e Joseph Henry realizaram experimentos com os quais puderam concluir que há íntima correlação entre os campos magnéticos e os campos elétricos, demonstrando posteriormente que cargas elétricas em movimento geram um campo magnético perpendicular e campos magnéticos variáveis produzem campos elétricos. O grupo de fenômenos ligados às ações recíprocas entre o campo elétrico e o magnético é denominado de eletromagnetismo (HEWITT, 2008).

Verifica-se que as correlações eletromagnéticas estão presentes no próprio seio da matéria, em sua constituição atômica, pois os elétrons, considerados como partícula, transladam ao redor de um núcleo, produzindo os fenômenos de diamagnetismo e paramagnetismo. Contudo, o elétron possui uma carga elétrica negativa e uma propriedade intrínseca denominada *spin*, (como se girasse em torno de seu próprio eixo), produzindo um campo magnético responsável pelo ferromagnetismo (HEWITT, 2008). Consequentemente pode-se verificar alguma influência sobre variadas substâncias químicas, orgânicas e inorgânicas, sendo possível inferir que os meios biológicos e seres vivos igualmente sofram esta influência eletromagnética no ambiente em que estejam inseridos.

Campos magnéticos podem ser criados por correntes elétricas contínuas ou variáveis, ou por substâncias tais que suas propriedades atômicas, moleculares e estruturais (por exemplo: *spin* dos elétrons, movimento orbital do elétron, disposição dos átomos e moléculas na rede cristalina) produzem um campo magnético capaz de transformar determinado material em um magneto. Sabe-se que cargas elétricas iguais se repelem e cargas diferentes se atraem. De forma análoga, no magnetismo os ímãs sempre possuem dois polos (“Norte” e “Sul”); polos iguais são repelidos entre si e polos diferentes são atraídos entre si. Quando dois ímãs estão frente a frente em uma situação de polos magnéticos de nomes diferentes (N-S), os campos atraem-se entre si, apresentando um Campo Magnético Estático (CME) (Diag. 1A). Caso contrário, em uma situação de polos iguais (N-N ou S-S) a contrapõem-se, contrabalançando a ação dos dois campos (repulsão), tem-se a compensação dos mesmos, ou seja, origina-se a condição de um Campo Magnético Compensado (CMC) com intensidade de campo magnético praticamente desprezível, tendendo a zero na região do centro geométrico das forças compensadas (Diag. 1B). As unidades de medida para densidade de fluxo magnético (intensidade do campo magnético) são Gauss (G) e Tesla (T), entre outras e suas subunidades correspondentes, que podem ser convertidas reciprocamente.

Diagrama 1. A- Esquema mostrando a atração magnética. B- Esquema mostrando a repulsão magnética. Estrela vermelha representa uma região indefinida onde os campos se anulam.

Fonte: Desidério (2017).

Tem sido sugerido que o emprego de campos magnéticos (de modo geral e em intensidades e maneiras variadas) pode incrementar a proliferação de bactérias e células (TRILLO et al., 2012; WANG et al., 2012; LOPES, 2007,). Contudo, outros trabalhos não obtiveram mudanças reprodutíveis após a aplicação de diversos tipos e intensidades de Campos Magnéticos em modelos experimentais com leveduras ou bactérias (SINCLAIR et al., 2006; NAKASONO et al., 2003; citados por CHEN; XU, 2013), tornando a comparação dos resultados inconclusiva.

Pretendeu-se com esta pesquisa verificar o efeito desses campos magnéticos, estáticos e compensados na proliferação celular, comparado a grupos controle. Para tanto, foi necessária a construção de um equipamento que produzisse uma câmara de Campo Magnético Estático (CME), entre dois ímãs atraindo-se, porém sem se tocarem e, inicialmente, outro dispositivo que produzisse a compensação de campos magnéticos nos três eixos cartesianos ortogonais, similar ao que foi descrito por Lopes (2007), chamado “Compensador Espacial Eletromagnético”, que é composto por eletroímãs. Propôs-se uma mudança neste aparelho, utilizando-se ímãs permanentes para a produção do CMC, resultando no mesmo efeito, e melhorando a versatilidade e portabilidade do dispositivo, deste modo passando a ser denominado de “Compensador de Campos Magnéticos” (CCM), em cujo interior foi produzida uma “Câmara de Campos Compensados” (CCC), região praticamente esférica de anulação dos campos.

A partir da utilização dos dispositivos acima mencionados para gerar CME e CMC, espera-se verificar se a disposição dos polos magnéticos influenciaria diretamente a

proliferação celular. Deste modo, as hipóteses propostas para este trabalho são: 1- Polos diferentes (Campo Magnético Estático / N-S / atração magnética) inibem a proliferação celular (JOUNI et al., 2013; BARNOTHY, 1964) ou podem estimulá-la a depender do tipo celular e de outros fatores (ZHANG et al., 2017; DINI; ABBRO, 2005; ROSEN, 2003). 2- Polos iguais (Campo Magnético Compensado / N-N / repulsão magnética) podem causar apenas uma das três alternativas a seguir: A) Nenhuma alteração na proliferação celular; B) Inibição da proliferação celular; C) Estímulo à proliferação celular.

A importância e relevância desta pesquisa reside em suas perspectivas futuras, podendo contribuir para investigações relacionadas à engenharia de tecidos e reparo tecidual, caso a alternativa (C) da segunda hipótese fosse observada, bem como controle de processos carcinogênicos, caso a alternativa (B) fosse verificada para as duas hipóteses (1 e 2). Igualmente poderia contribuir com pesquisas sobre a atuação de campos magnéticos na indução ou redução de tumores por meio de exposição ao magnetismo. Poderiam ser avaliados os efeitos da exposição a estes tipos de campos magnéticos em relação às vias metabólicas celulares, contribuindo para estabelecer níveis seguros de exposição de seres vivos a campos magnéticos.

Atualmente existem muitas pesquisas sobre o efeito de campos magnéticos e eletromagnéticos em seres vivos, mas poucas que, além disso, mostrem a expressão proteica para que sejam entendidos os mecanismos de ação destas influências. Até o momento da realização do projeto de pesquisa, desconheciam-se pesquisas publicadas em periódicos científicos que tivessem pesquisado com Campos Magnéticos Compensados e Estáticos da forma proposta neste trabalho, justificando esta pesquisa. Pretendeu-se construir conhecimento acerca destas duas últimas propostas, aliando a exposição de células a Campos Magnéticos Compensados e Estáticos para se entender os efeitos biológicos e em nível intracelular, realizar a análise proteômica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2. Revisão de Literatura

2.1. Células tronco

Inúmeras pesquisas estão sendo realizadas atualmente com células tronco, que podem ser definidas como sendo células indiferenciadas capazes de se especializar em quaisquer tipos celulares presentes no corpo humano (LANCE, 2013). Existem alguns tipos de células tronco classificadas de acordo com seu potencial de diferenciação, a saber:

2.1.1. **Células tronco totipotentes:** são células capazes de originar “todos os tipos de células e tecidos do corpo, incluindo tecidos embrionários e extraembrionários”. Exemplos de células tronco totipotentes são o óvulo fecundado e a fase de 16 células da mórula (LANCE, 2013).

2.1.2. **Células tronco pluripotentes:** são capazes de gerar células dos três folhetos embrionários (tecidos primários do desenvolvimento do embrião): o endoderma, o mesoderma e o ectoderma. Estas células podem gerar todos os tipos de tecidos do corpo, com exceção dos tecidos extraembrionários. São chamadas de células tronco embrionárias, pois são oriundas da massa celular interna do blastocisto (estágio de desenvolvimento embrionário posterior à mórula) (LANCE, 2013).

2.1.3. **Células tronco multipotentes:** possuem a capacidade de originar um número limitado de células diferenciadas ou especializadas. São encontradas em quase todo o corpo, sendo capazes de gerar células dos tecidos de que são provenientes. As células da medula óssea, as células-tronco neurais do cérebro, as células do sangue do cordão umbilical e as células mesenquimais são exemplos de células-tronco multipotentes (LANCE, 2013).

2.1.4. **Células tronco de pluripotência induzida** (iPS – induced Pluripotent Stem-cells): são células adultas já diferenciadas que foram reprogramadas geneticamente, revertendo-as ao estado de pluripotência, tornando-se similares às células tronco embrionárias (LANCE, 2013).

Neste trabalho optou-se por utilizar células tronco multipotentes (mesenquimais-MS), por suas perspectivas terapêuticas, obtidas de camundongos da linhagem A/J. A utilização de células embrionárias em pesquisas esbarra em inúmeras dificuldades de ordem técnica, ética e etc.; no entanto, utilizações terapêuticas com células tronco mesenquimais têm sido uma alternativa, conforme Monteiro; Argolo Neto e Del Carlo (2010):

A terapia celular com MSC é uma alternativa terapêutica promissora, pois a diferenciação dessas células em tecidos mesodermis e não mesodermis amplia as possibilidades de utilização clínica, tanto em humanos, quanto em animais. Além disso, as recentes descobertas sobre o comportamento imunológico das MSC aumentaram as perspectivas terapêuticas com o uso dessas células pela possibilidade de tratamento alógeno.”

2.2. Exposição de meios biológicos a campos magnéticos

Como citado anteriormente, alguns estudos sugerem que Campos Magnéticos (CM) estejam envolvidos tanto na inibição ou estimulação da proliferação celular, além de outros efeitos no meio biológico em geral. A literatura é bastante heterogênea no sentido que cada pesquisa utiliza parâmetros e *design* experimentais específicos, dificultando muito a comparação. A maioria dos estudos é realizada com eletroímãs com intensidade de fluxo magnético variável. Alguns estudos utilizam campo magnético sinusoidal produzido por corrente elétrica alternada, gerando campos magnéticos com frequências que também podem ser variadas. Neste trabalho os campos magnéticos utilizados são estáticos, e são produzidos por ímas permanentes.

Como parâmetro inicial, Rosen (2003) classifica as densidades de fluxo de CME como: fracos < 1 mT, moderados de 1 mT a 1 T (1.000 mT), fortes de 1T a 5 T (1.000 mT a 5.000 mT) e ultrafortes > 5 T (> 5.000 mT). Os ímas utilizados neste trabalho de pesquisa possuem uma intensidade média de campo magnético de 378 mT na face do ímã, sendo portanto, considerados de intensidade moderada individualmente. Porém, devido à montagem e disposição dos ímãs par a formação do CME, o campo que atuou na amostra biológica foi bem menor, mesmo assim, permanecendo na faixa de campos moderados.

A título de comparação, a intensidade do campo magnético da Terra é medida em nT (nano Tesla = 10^{-9} T), e considerado fraco, por ser um valor baixo e variável dependendo do local da medição. Na superfície da região polar do planeta a intensidade está em torno de 70.000 nT (0,07 mT) e na região equatorial está em aproximadamente 35.000 nT (0,035 mT). No Atlântico Sul a medição se encontra por volta de 24.000 nT (0,024 mT), enquanto que na área localizada entre a Austrália e a Antártida é 66.000 nT (0,066 mT) (BRANCO, 2015). A disposição dos ímãs da forma proposta para se criar um CMC é capaz de anular o campo geomagnético.

Os campos magnéticos estáticos fortes e ultrafortes possuem uma intensidade suficiente para alterarem a orientação de uma variedade de moléculas orgânicas anisotrópicas diamagnéticas, sendo este o mecanismo de ação proposto para os efeitos dos campos desta ordem de intensidade. Porém para os campos moderados o mecanismo pode ser outro. A preponderância das evidências indica que os CM de intensidade moderada influenciam

aqueles sistemas biológicos cuja função depende das propriedades das membranas excitáveis. Como estes campos são insuficientes para influenciar moléculas individuais, deve haver algo único nas membranas biológicas que as torna suscetíveis a estes campos de modo a alterar a função celular. Foi sugerido que os CME alteram a função do fluxo de cálcio transmembrana. Um mecanismo geral de ação de CME em sistemas biológicos agiria na estrutura molecular das membranas excitáveis, um efeito suficiente para modificar a função de canais ion-específicos. (ROSEN, 2003; 1990).

Historicamente desde o século passado, estudos vêm sendo realizados tentando verificar o efeito de campos magnéticos ou eletromagnéticos em sistemas biológicos. Em 1948, na Universidade de Budapeste, Barnothy (1964), submeteu um grupo de ratos (um macho e duas fêmeas) a um campo magnético estático produzido por eletroímãs de aproximadamente 5.900 Oersted (5.900 mT). Outro grupo foi o controle em iguais condições, porém sem a exposição. Anteriormente à ativação dos eletroímãs, houve acasalamento. Durante a exposição ao campo magnético, todos os ratos dos dois grupos eram pesados diariamente. Foram listados os efeitos observáveis do campo magnético estático sobre os seres vivos. Entre outros se destacaram: retardamento no crescimento de ratos novos; rejeição de tumores implantados; alterações hematológicas; retardamento na cura de ferimentos e na regeneração de tecidos; efeitos sobre o sistema nervoso central; queda da temperatura corporal; desaparecimento do ciclo do impulso reprodutor; reabsorção de embriões no útero; decréscimo na respiração dos tecidos, inibição de culturas bacterianas durante sua fase estacionária máxima e alterações patológicas no fígado. Concluiu que não deveria ser excluída a possibilidade do campo magnético retardar atividades mitóticas (BARNOTHY, 1964).

Saito, Suzuki e Suzuki (2006), em Tóquio, observaram efeitos teratogênicos em fetos de camundongos expostos *in utero* a um campo magnético estático de 400 mT, aplicado na direção dorso-ventral das progenitoras. Os grupos experimentais e controle consistiam de 20 animais cada, multiplicados pelos períodos gestacionais em que foram aplicadas as exposições, totalizando 160 animais. Os camundongos fêmeas prenhes foram submetidos a 60 minutos de exposição ao campo em diferentes períodos gestacionais de 7,5 a 14,5 dias. Malformações foram observadas aparentemente como efeito da exposição a campos magnéticos estáticos nos grupos experimentais, tais como: polidactilia, fissura abdominal, costelas fundidas, décima terceira costela vestigial, costela lombar, hérnia cerebral, e rabo enrolado com fusão de vértebras caudais.

Pesquisas deste tipo continuam até recentemente, de certo modo corroborando os achados *in vivo* com resultados semelhantes. Em 2016, pesquisadores (BEKHITE et. al, 2016)

analisaram o efeito de campo magnético sinusoidal (CMS) de 50 Hz e 10 mT de intensidade (Corrente Alternada-AC) ou CME (Corrente Direta-DC) *versus* CMs de 1 T no desenvolvimento embrionário de camundongos. A exposição por 20 dias durante a gestação aos CMs de 10 mT aumentaram reabsorções e fetos mortos, diminuíram o comprimento cabeça-cauda, peso, diminuíram a diferenciação de vasos sanguíneos e causaram alterações histológicas, acompanhadas por uma diminuição da expressão da proteína do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em variados órgãos. Em corpos embrioides derivados de células-tronco embrionárias, a exposição a CMs de 10 mT aumentou as espécies reativas de oxigênio (ROS), diminuiu marcador vascular, bem como expressão de VEGF e aumentou a apoptose. Concluíram que a combinação dos dados dos experimentos *in vivo* e *in vitro* identificaram o VEGF como um importante mediador durante o desenvolvimento embrionário que pode ser influenciado por CMs de alta intensidade, que em consequência leva a severas anormalidades nos órgãos dos fetos e na formação de vasos sanguíneos. Estas pesquisas *in vivo* com animais demonstram o potencial risco teratogênico dos CMs, por extrapolação, em humanos, especialmente para mulheres grávidas.

Relatos sobre o efeito de CME no sistema nervoso têm sido mais consistentes. Alterações em eletroencefalogramas foram percebidas em coelhos com campos de somente 20 mT. Mudanças no potencial evocado somatosensório de ratos durante exposição a campos de 50 a 400 mT têm sido reportadas; mudanças no potencial evocado visual em gatos foram observadas durante e imediatamente após exposição a campos de 120 mT. Mudanças no comportamento operante de ratos expostos a um campo de 600 mT foram descritas, apesar de que não foram observados efeitos persistentes de CME, quando a habilidade de aprendizagem de jovens camundongos foi testada seguindo uma exposição repetida a campos de 500 mT. (HONG et al., 1988; NAKAGAWA; MATSUDA, 1988; ROSEN; LUBOWSKY, 1987; KLIMOVSKAYA; SMIRNOVA, 1976; KHOLODOV, 1974; citados por ROSEN, 2003).

Outros experimentos em animais com campos magnéticos fortes e ultrafortes descrevem que o eletroencefalograma de macacos mostrou mudanças reprodutíveis durante exposição a campos de 2 a 9 T, e mudanças visuais comportamentais foram observadas em macacos *Saimiri sciureus* expostos a campos da magnitude de 4,6 a 7 T (TACH, 1968; BEISCHER; KNEPTON, 1966; citados por ROSEN, 2003).

Para humanos, segundo França et al. (2005), o *International Committee on Non Ionization Radiation Protection* (ICNIRP), estabelece diretrizes e limites máximos de intensidade para exposição de pessoas a campos elétricos e magnéticos a 60 Hz de frequência, em fontes de alta tensão e corrente.

Populações de baixa renda na região metropolitana de São Paulo estão mais expostas às Linhas de Transmissão (LT) de energia elétrica e os trabalhadores desta profissão estão mais próximos de suas altas intensidades de campos elétricos e magnéticos, bem como das frequências emitidas, sendo associadas a riscos de leucemia e cânceres desde a década de 70 (HABERMANN et al., 2010).

Para campos magnéticos, os níveis estabelecidos para trabalhadores em jornada de trabalho são de 4200 mG (miliGauss, que equivale a 0,42 mT) e para o público em geral em exposição permanente, 833 mG (0,0833 mT). Os efeitos biológicos em indivíduos observados expostos às intensidades de campo magnético entre 1.000 e 5.000 mG a 60Hz (0,1 e 0,5 mT) são poucos, como mudanças no metabolismo do cálcio e suspeitas de supressão na produção de melatonina. Contudo os efeitos observados em intensidades maiores entre 5.000 mG e 500.000 mG (0,5 e 50 mT) são mais intensos variando respectivamente em gradação entre mudanças na latência de respostas em testes complexos de raciocínio, sensações visuais oscilatórias (fosfenos magnéticos), excitabilidade do sistema nervoso central e outros efeitos agudos, bem como efeitos biológicos irreversíveis, tais como fibrilações cardíacas (FRANÇA et al., 2005). Estas intensidades citadas de acordo com Rosen (2003) se enquadrariam na categoria de campos fracos e moderados.

In vitro, Huang et al. (2006) observaram inibição de crescimento celular em duas linhas de células de câncer humano (HL-60 e SK-Hep-1) submetidas à exposição a *Low Frequency Magnetic Fields* – LFMF (Campos Magnéticos sinusoidais de Baixa Frequência - CMBF - não estáticos). A intensidade do CMBF, utilizada foi de 20 mT a uma frequência de 50 Hz. Observaram também que houve o aumento da concentração de íons de sódio (Na^+) e potássio (K^+) e aumento da osmolaridade em células sobrenadantes comparadas com o grupo controle (HUANG et al., 2006).

Jouni et al. (2013) submeteram a campos magnéticos estáticos, células-tronco da medula óssea de ratos, em diferentes intensidades (4, 7 e 15 mT) e diferentes períodos de exposição (24, 48, 72, 96 h). Após os procedimentos para contagem das células, o número médio de células inteiras e vivas foi considerado como taxa de proliferação e de sobrevivência respectivamente. O aumento da intensidade e do tempo da exposição ao campo magnético diminuiu a porcentagem de viabilidade e a taxa de proliferação nos grupos tratados comparados com o controle correspondente. (JOUNI et al., 2013). Deste modo, ao utilizar um CME, verificou-se que a proliferação celular foi inibida a partir de 72h de exposição ao CME de 15 mT.

No entanto, tem sido sugerido que o emprego de campos magnéticos pode incrementar a proliferação de bactérias e células (LOPES, 2007). Um aumento na proliferação de células tumorais foi obtido ao utilizarem um CMBF (50 Hz) e densidade de fluxo da ordem de 100 μ T (0,1 mT) (TRILLO et al., 2012; FEDROWITZ et al., 2002; THUN-BATTERSBY et al., 1999). Wang et al., (2012) conseguiram um efeito aparentemente proliferativo ao exporem osteoblastos *in vitro* à ação de CMEs da ordem de 3,9 mT, por diferentes períodos promovendo a maturação e mineralização de osteoblastos. Tais resultados e efeitos discrepantes sugerem que outras variáveis estejam envolvidas de forma dependente para que os efeitos dos CMEs variem tanto.

Portanto, como esta pesquisa propõe a utilização de ímãs permanentes para gerar o CME, a inibição da proliferação celular foi aceita como hipótese para este trabalho, a ser corroborada ou não com o dispositivo e nas condições propostas, pois as pesquisas citadas utilizaram eletroímãs. Por outro lado, se a situação de repulsão magnética for utilizada com polos iguais (N-N) produzindo um CMC (diferindo das condições supracitadas), a hipótese fica em aberto sem resultados previamente esperados, porém com as opções mencionadas na Introdução.

2.3. Estado da Arte

As pesquisas mais recentes com campos magnéticos têm demonstrado efeitos biológicos diversos e heterogêneos, tanto quanto suas metodologias e materiais utilizados.

Zhang et al. (2017) examinaram sistematicamente os efeitos de um CME com 1T de intensidade por 48 h em sete linhagens de células cancerígenas humanas, cinco linhagens de células não-cancerígenas humanas e duas linhagens de células não-cancerígenas de roedores. Os resultados mostraram que este tipo de campo não teve impacto aparente no ciclo celular ou na morte celular, no entanto, em alta densidade celular o CME reduziu o número de células em seis de sete linhagens celulares de câncer humano sólido. Em outras linhagens obtiveram aumento ou nenhum efeito sobre a proliferação celular, demonstrando que o CME de 1T afeta a proliferação celular de modo tipo celular e densidade dependentes, indicando um uso clínico potencial em terapia de câncer de último estágio.

Marędziak e colaboradores (2017) avaliaram os efeitos do CME de 0,5 T (500 mT) de intensidade nas taxas de viabilidade e proliferação de células estromais humanas derivadas de tecido adiposo (hASC) via ativação do caminho de sinalização *phosphoinositide 3-kinase/Akt* (PI3K/Akt). Em uma cultura de 7 dias foram examinadas a cinética de crescimento e o tempo

de duplicação da população (TDP). Também examinaram a morfologia celular e os níveis de marcadores de senescência celular. Verificaram que a exposição ao CME aumentou a viabilidade destas células, no entanto, o efeito foi bloqueado quando as mesmas foram tratadas com um inibidor da PI3K. Compararam este efeito com uma análise de *Western Blot* da expressão da proteína Akt. Verificaram se a resposta à estimulação do CME é dependente do engajamento da integrina e mediram a expressão gênica da integrina. Os resultados sugeriram que a estimulação usando CME é um método viável para aumentar a viabilidade das hASC e que este campo está envolvido em mecanismos associados ao controle de potenciais eventos de sinalização de proliferação celular.

Em um trabalho semelhante, Wang et al. (2016) trataram células tronco derivadas de tecido adiposo de ratos (ASC) por 7 dias com um CME de 0,5 T (500 mT), que inibiu a viabilidade, proliferação, expressão de antígenos de superfície, secreção de citocinas, expressão de marcadores genéticos de célula tronco e diferenciação adipogênica e osteogênica mas não afetou a integridade de DNA em ASC com ou sem marcação por nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro.

Os efeitos de CMEs na intensidade de 0,4 T (400 mT) na proliferação de células tronco da polpa dental (DPSCs) foram verificados (LEW, et al., 2016). Os resultados mostraram que as células tratadas com CME tiveram uma taxa de proliferação e valor de anisotropia mais altos. Os íons de Ca^{2+} intracelular foram ativados pelos CMEs. Imagens de microscopia por fluorescência demonstraram que as células tratadas exibiram uma intensidade de fluorescência maior na estrutura de actina do citoesqueleto. A viabilidade celular e o ensaio PCR em tempo real sugeriram que a cascata de sinalização p38 foi ativada. Testes de intensidade de actina F mostraram que as células tratadas com SB203580 (inibidor da p38 MAPK) diminuíram mesmo com a exposição ao CME. Além destes efeitos, a taxa de actina F/G aumentou devido a uma reorganização demorada do citoesqueleto pela inibição da p38 MAPK. Conforme estes resultados os autores sugerem que um CME de 0,4 T afetou as membranas celulares das DPSCs e ativou íons de cálcio intracelular. Este efeito pode ativar a sinalização da p38 MAPK e, portanto reorganizar o citoesqueleto, o que contribui para um aumento na proliferação celular.

Outro objetivo de pesquisadores (LIN, et al., 2015), foi avaliar os efeitos criopreservativos de CMEs em DPSCs durante a criopreservação. DPSCs humanos foram extraídos e congelados com CMEs 0,4 T ou 0,8 T (400 ou 800 mT) e armazenados a -196°C por 24 h. Durante o congelamento, as células foram suspensas em meio de congelamento contendo 0,3 ou 10% de DMSO. Depois do descongelamento, as mudanças na taxa de

sobrevivência foram determinadas por citometria de fluxo. Para entender os possíveis mecanismos crioprotetores do CME, a fluidez da membrana das DPSCs expostas ao CME foi testada. Os resultados mostraram que quando o meio de cultura era livre de DMSO, as taxas de sobrevivência celular após o descongelamento aumentaram de 2 a 2,5 vezes, quando as células foram expostas ao CME de intensidades de 0,4 ou 0,8 T (400 ou 800 mT), respectivamente. Adicionalmente, após a exposição a CME de 0,4 T, a anisotropia fluorescente das células aumentou significativamente na região hidrofílica. Estes resultados mostram que a exposição ao CME melhorou a criopreservação livre de DMSO. Este fenômeno pode ocorrer devido à melhora na estabilidade da membrana para resistir a danos causados por cristais de gelo durante o procedimento de congelamento.

Investigadores também examinaram os efeitos de CMEs de 0,4 T (400 mT) na diferenciação condrogênica em células mesenquimais da medula óssea de humanos (BMSCs). Os resultados mostraram que este campo magnético aplicado por 14 dias promoveu uma forte resposta de diferenciação condrogênica nas BMSCs cultivadas; igualmente, o fator de crescimento de transformação (TGF)- β 3 esteve presente; isto é, uma resposta sinérgica de um CME e TGF- β 3 na diferenciação condrogênica das BMSCs foi observada. Além disso, o CME sozinho causou a secreção de TGF- β na cultura e os efeitos do CME foram anulados pelo bloqueador do receptor do TGF- β (SB-431542). Estes dados mostraram que CME de intensidade moderada podem induzir a condrogênese em BMSCs através de um caminho TGF- β dependente. Estes achados possuem potenciais aplicações importantes nas estratégias de engenharia tecidual de cartilagens (AMIN, et al., 2014).

Com o desenvolvimento da tecnologia dos aparelhos eletroeletrônicos, em especial das telecomunicações, os seres vivos em geral têm estado cada vez mais em contato com campos magnéticos e eletromagnéticos de variados tipos e níveis de intensidade. Isso tem preocupado a comunidade científica com relação à exposição dos seres humanos a campos magnéticos estáticos e eletromagnéticos derivados das correntes elétricas associadas a estes aparelhos (CHEN; XU, 2013; SAITO; SUZUKI; SUZUKI, 2006).

Em 1997, um seminário internacional foi promovido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Comissão Internacional de Proteção à Radiação Não-Ionizante sobre os efeitos biológicos e os riscos à saúde dos CMEs (SAITO; SUZUKI; SUZUKI, 2006; REPACHOLI; GREENEBAUM, 1999). Os grupos de trabalho deste seminário concluíram que a exposição a CMEs em níveis correntes nos ambientes comuns, ou a exposição aguda a CMEs em densidades de fluxo abaixo de 2 T (2.000 mT), não possuem evidências de consequências adversas à saúde humana. No entanto, os relatórios sobre os efeitos biológicos

da exposição crônica aos CMEs eram limitados e são necessários mais experimentos de forma repetitiva para o acúmulo de dados sobre o assunto (REPACHOLI; GREENEBAUM, 1999). Em alguns países, comitês governamentais têm estabelecido limites de exposição voltados principalmente para os altos campos magnéticos dos exames por imagens de Ressonância Magnética (MRI). Tais campos são os mais altos a que os pacientes estão expostos no meio social comum, com densidades de fluxo da ordem de 2,5 T (2.500 mT) (SAITO; SUZUKI; SUZUKI, 2006; INIRC, 1994; MURAKAMI; TORII; MASUDA, 1992; IRPA/INIRC, 1990).

Outros aparelhos médicos utilizando CMEs de até 10 T (10.000 mT) foram desenvolvidos, aumentando deste modo o risco de exposição a CMEs de altas intensidades. (SAITO; SUZUKI; SUZUKI, 2006; REPACHOLI; GREENEBAUM, 1999). Até o momento da pesquisa de Saito, Suzuki e Suzuki (2006), eram desconhecidos os tipos de processos bioquímicos afetados pela exposição a CMEs. A partir dos resultados da análise proteômica e da literatura revisada, espera-se entender tais processos bioquímicos e mecanismos de ação dos CMEs e CMCs.

Com relação a campos eletromagnéticos exclusivamente, estudos epidemiológicos sugerem que esta exposição esteja associada a um elevado risco de câncer e outras doenças em humanos (FEYCHTING et al., 2005). Para apoiar e explicar tais observações, muitos estudos em laboratórios foram conduzidos, mas os resultados foram controversos e não foi possível ter uma conclusão clara para avaliar o risco dos campos eletromagnéticos à saúde (CHEN; XU, 2013).

É consenso que uma das prioridades da pesquisa com campos eletromagnéticos (e por extrapolação para CME e CMC) é elucidar os efeitos biológicos desta exposição e o mecanismo de ação subjacente. As proteínas são muito importantes nos organismos e assume-se que qualquer impacto biológico do campo eletromagnético deve ser mediado por alterações na expressão proteica (CHEN; XU, 2013). Estas alterações podem ser verificadas por meio da análise proteômica.

2.4. Análise Proteômica

A proteômica obteve um rápido progresso nos últimos anos e isso se deve ao projeto genoma, que permitiu a identificação do genoma humano e de outras espécies, e também ao desenvolvimento de novas técnicas de separação de proteínas, utilizando-se gel ou não, bem como a evolução do processo de identificação proteica, utilizando espectrometria de massas (THONGBOONKERD, 2004). É importante mencionar que o conhecimento do genoma não é

suficiente para o entendimento de alterações no organismo, já que modificações pós-tradução são naturais. Assim, quando se pretende estudar as vias metabólicas celulares, com o intuito de encontrar possíveis alvos para fármacos, além de outros objetivos, é necessário avaliar o proteoma, que é a composição de todas as proteínas expressas pelo genoma de um organismo. Outras técnicas de análise proteica como, por exemplo, o *western blotting*, são capazes de identificar apenas uma proteína de cada vez, sendo ainda necessário utilizar anticorpos específicos para cada uma, diferentemente da análise proteômica, que permite a identificação de inúmeras proteínas simultaneamente (ARTHUR et al. 2002). Atualmente tem-se empregado a Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC) aliada à espectrometria de massas, que permite a análise proteômica detalhada e com maior precisão de amostras complexas.

Neste trabalho foi avaliado o efeito do CME e do CMC na proliferação de células tronco multipotentes (mesenquimais-MS) obtidas de camundongos da linhagem A/J. A análise proteômica foi empregada para ajudar a desvendar os mecanismos envolvidos na alteração da proliferação celular induzida por estes campos magnéticos.

3 PROPOSIÇÃO

3. Proposição

3.1. Objetivo geral

Observar e descrever os mecanismos moleculares envolvidos na proliferação e viabilidade de células mesenquimais indiferenciadas submetidas a campos magnéticos compensados e estáticos, utilizando como ferramenta a análise proteômica, através de cromatografia líquida de ultra performance associada à espectrometria de massas.

3.2. Objetivos específicos

Este trabalho foi desenvolvido em etapas, com os seguintes objetivos, a saber:

- a) Construir um dispositivo com base de metal não magnético para ímãs permanentes, visando à:
 1. Geração de um Campo Magnético Estático (CME);
 2. Geração de um Campo Magnético Compensado (CMC);
 - b) Expor culturas de células mesenquimais a um CME e a um CMC, ou a campo algum (controle);
 - c) Realizar a contagem celular (manual por técnica de coloração por azul de tripan) a fim de verificar a proliferação e viabilidade;
 - d) Após nova exposição e novos ensaios, realizar a análise proteômica por Cromatografia Líquida de Ultra Performance aliada à Espectrometria de Massas, como ferramenta para desvendar os mecanismos moleculares possivelmente envolvidos nos efeitos na proliferação celular observados nos experimentos anteriores, nos casos em que foi observada diferença significativa na proliferação e/ou viabilidade celular.
-
-

4 MATERIAL E MÉTODOS

4. Material e métodos

4.1. Design experimental para o dispositivo “Compensador de Campos Magnéticos”

Para o início do projeto foi executado inicialmente um protótipo do “Compensador de Campos Magnéticos”. Para tal, foram utilizadas quarenta e duas pastilhas magnéticas permanentes de uma liga de Neodímio, Ferro e Boro (NeFeB) com tamanho de $\varnothing 2,0\text{cm} \times 0,9\text{cm}$, comumente chamados de ímas de Neodímio. Para compor uma barra magnética foram utilizadas sete pastilhas, resultando em uma barra de aproximadamente 7 cm de altura, totalizando seis barras. A intensidade de campo medida de cada barra magnética está descrita na Tabela 1.

Para verificação da adequação do equipamento, foram feitas as medições da intensidade do campo magnético gerado em cada barra magnética inteira, empregando-se um medidor Tesla (Teslameter PHYWE-Alemanha), que mede a intensidade de campo em miliTesla (mT). Esta etapa foi realizada na Faculdade de Ciências, Departamento de Física, da UNESP-Bauru, supervisionada pelo Prof. Dr. André Luiz Malvezzi. A medição foi realizada com o lado liso da ponta do sensor.

Tabela 1. Medidas das intensidades de campo magnético em miliTesla

Nº ímã	Valor S (+)	Valor N (-)
1	476	476
2	495	464
3	453	478
4	465	453
5	485	480
6	452	476
média	471,0	471,2
desv.padr.	17,4	10,5

Fonte: Desidério (2017).

Foi construído um “Compensador de Campos Magnéticos”, semelhante ao descrito por LOPES (2007), mas empregando-se ímãs permanentes. Foram colocados, em uma base segura parafusada de metal não ferromagnético (p. ex.: latão ou aço inox), seis barras magnéticas permanentes gerando campos magnéticos triortogonais (nos três eixos cartesianos, X, Y, Z), contrapondo-se seus polos magnéticos de nomes iguais (N-N) (Diag. 2). De acordo com as leis do magnetismo, sabe-se que o equipamento produz no interior do dispositivo, uma “Câmara de Campos Compensados” (CCC), com um campo resultante praticamente nulo (valor desprezível), ou seja, um campo compensado, pois

Diagrama 3. Esquema de montagem das barras magnéticas permanentes para a geração do campo magnético estático

Diagrama 2. Esquema de montagem das barras magnéticas permanentes para a compensação dos campos magnéticos. As setas demonstram a direção das forças magnéticas de repulsão

os campos de repulsão seriam compensados, uns pelos outros, anulando-se mutuamente.

De outro modo, quatro magnetos poderiam ser removidos e os polos dos dois remanescentes deveriam ser diferentes (N-S), observando-se a atração magnética entre os ímãs, ou um Campo Magnético Estático, sendo acondicionados em outra base de metal não ferromagnético de conformação específica para apenas dois ímãs permanentes mais a amostra entre os dois (Diag. 3).

4.2. Preparo dos poços (placas de Petri)

No *design* experimental com os Campos Compensados (Diag. 1) o espaço para que a amostra fosse influenciada era um cubo de 20 mm devido ao diâmetro das barras magnéticas. Para cada experimento foi necessária uma placa de Petri menor que este diâmetro.

Uma adaptação foi feita cortando-se placas de Petri de 24 poços (TPP, Alemanha). Cada poço foi cortado individualmente com uma lâmina com diamante (Maruto, Japão) usada para cortar dentes, já existente no laboratório de Bioquímica da FOB-USP. Os poços foram cortados pela metade, resultando em um poço com o tamanho de: Ø1,8 cm X 0,8 cm a fim de que coubessem no interior da CCC. Foram cortados 50 poços individualmente (Figura. 1).

Após isso os poços cortados foram lavados para retirada dos resíduos finos com uma lavadora ultrasônica (Unique, Brasil), por 5 minutos. Posteriormente foram lavados com detergente Extran. Os poços foram deixados em repouso por 24 h e enxaguados 40 vezes em água corrente e 10 vezes em água deionizada. Foram secos em estufa por 24 h e embalados de duas em duas placas recortadas em grau cirúrgico e enviados para esterilização por raios gamma no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da USP em São Paulo.

Figura 1 – Preparo dos poços que foram utilizados inicialmente no trabalho. A- corte da placa de 24 poços. B- corte de um poço pela metade. C- poço finalizado.

Fonte: Desidério (2017).

4.3. Construção do “Compensador de Campos Magnéticos” – Protótipo

Inicialmente foi projetado e construído o protótipo do dispositivo “Compensador de Campos Magnéticos” (Fig. 2). Realizaram-se simulações computacionais de campos magnéticos para testar o efeito de compensação (anulação) de campos que foram realizadas no *software* Vizimag (BEETESON, 2009) (Fig. 3). O material utilizado foi o Latão.

Figura 2 – Design inicial do Compensador de Campos Magnéticos. A- Esboço feito à mão. B- construção sem ímãs. C- montagem com ímãs. D- Compartimento feito de alumínio recortado em forma de caixa.

Fonte: Desidério (2017).

Figura 3 – Simulação computacional da compensação de campos produzida no centro da composição com os ímãs, utilizando *software* Vizimag. Área central em preto significa ausência de campo magnético. (BEETESON, 2009).

Fonte: Desidério (2017).

4.4. Banco de células

Foram utilizadas células mesenquimais primárias obtidas de camundongos machos da linhagem A/J. Os animais são albinos e amplamente utilizados em pesquisas com câncer e imunologia, por serem suscetíveis a diversos tipos tumores induzidos por agentes carcinogênicos. São camundongos bastante utilizados e presentes no biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.

Estas células constam de um banco de células obtidas anteriormente de acordo com o projeto aprovado pelo Comitê de Ética com número de protocolo: 016/2008, de autoria da Professora Dra. Camila Peres Buzalaf. O fenótipo de células mesenquimais foi confirmado por citometria de fluxo e mostrou que na 9ª passagem, as células são negativas para CD34 e CD45, e positivas para CD44, CD73, Sca-1 e CD90.1. Estas células foram descongeladas para expansão até a 9ª passagem para utilização nos experimentos. Durante a expansão, as células foram incubadas a 37°C, 5% CO₂ e o meio trocado a cada 3-4 dias. Para o subcultivo, as mesmas foram tripsinizadas com tripsina EDTA a 0,25% por 3 min a 37°C e posteriormente cultivadas na densidade de 3×10^5 células em garrafas de 75 cm².

Após a composição do banco de células, as células descongeladas foram cultivadas em garrafas de 25 cm² e tratadas com α MEM + 20% SFB, para serem utilizadas em experimentos individuais (uma garrafa por experimento).

4.5. Experimentos exploratórios

Um experimento piloto exploratório teve como objetivo plaquear uma determinada quantidade de células nos poços recortados citados previamente, porém com diferentes tampas e uma amostra em uma placa de petri de Ø40 mm (somente a título de comparação), para verificar qual a tampa mais adequada que protegeria as células e possibilitaria o fechamento do poço sem, contudo, vedá-lo. Este experimento também teve o objetivo de determinar a quantidade inicial de células. O resultado que se mostrou mais adequado foi o uso de uma tampa feita de alumínio recortado.

Outros experimentos exploratórios mostraram falhas no equipamento protótipo e na metodologia, e a necessidade de amplas correções. O equipamento e a metodologia a serem utilizados mostraram-se bastante complexos inicialmente. O dispositivo inicial para geração do Campo Magnético Compensado era muito complexo em sua utilização e não estava adaptado para produzir um Campo Magnético Estático, gerando somente um Campo Magnético Compensado, (sendo seu nome “Compensador de Campos Magnéticos” - CCM)

(Fig. 2). O tamanho da Câmara de Campos Compensados (CCC), por exemplo, onde ficariam as células, era muito pequeno e foram necessários 72 parafusos para montar todo o equipamento. Cogitou-se a possibilidade de *redesign* do dispositivo, após a tentativa de se levar a cabo alguns experimentos de contagem celular manual que se mostraram bastantes difíceis de serem realizados nas condições acima mencionadas.

Deste modo, foi realizado o *redesign* do CCM, para que pudesse gerar os dois tipos de campos conforme a disposição dos ímãs, no mesmo dispositivo: com 6 ímãs de mesmos polos voltados para o centro, obtém-se o Campo Magnético Compensado, e com apenas 2 ímãs, no topo e outro na base, com polos diferentes, obtém-se o Campo Magnético Estático (cf. Diagramas 4). Inicialmente foi esboçado e finalizado como rascunho em 3D, e simulado seu Campo Magnético Compensado (Fig. 4). Foi feito o desenho técnico de acordo com normas de engenharia a fim de que fosse construído em tornearia mecânica o novo Dispositivo Gerador de Campos Magnéticos Estático e Compensado – HGA1 (DGCMEC–HGA1 - Fig. 5). O material utilizado foi Aço Inoxidável puro, sem Carbono. O *design* inicial havia sido proposto com fechamento por apenas um parafuso, mas no projeto do desenho técnico foi realizado um desenho com travas que, quando foram construídas, não funcionaram, pois estas travas não suportaram a força magnética dos ímãs em repulsão. Após a substituição das travas por 3 parafusos, o novo DGCMEC–HGA1 foi montado no Laboratório de Física da Faculdade de Ciências na Universidade Estadual Paulista, Campus de Bauru, sob supervisão do co-orientador, Prof. Dr. André Luiz Malvezzi.

Diagrama 4. A- Disposição de 6 ímãs para formar um CMC . B- Disposição de 2 ímãs para formar um CME.

Fonte: Desidério (2017).

Figura 4 – A- Esboço. B- Finalização em 3D (três Dimensões). C- Simulação do CMC, utilizando *software* Vizimag (BEETESON, 2009), do Dispositivo Gerador de Campos Magnéticos Estático e Compensado – HGA1 (Abaixo, na simulação, a área central em preto significa ausência de campo magnético – Plano de corte transversal).

Fonte: Desidério (2017).

Figura 5 – A- Desenho de acordo com Normas Técnicas de engenharia 2D (duas Dimensões). B- Esquema de montagem 3D. C- Foto durante o processo de construção do Dispositivo Gerador de Campos Magnéticos Estático e Compensado – HGA1. Tamanho final: Cubo de 74 X 74 X 74 mm.

Fonte: Desidério (2017).

4.6. Medição da intensidade dos campos magnéticos

As medições foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru por um Gaussímetro (teslameter PHYWE, Alemanha), em ímãs de Neodímio (liga metálica de Neodímio, Ferro e Boro - NeFeB) medindo Ø 60 mm X 20 mm, marcados com marcadores permanentes em fitas adesivas coloridas.

Uma marcação foi feita nas duas faces de cada um dos seis ímãs, colando-se as fitas adesivas azuis e riscando-se por cima com um marcador de ponta fina azul escura os pontos a serem medidos conforme o Diagrama 3:

Diagrama 5 – A- Marcação dos 9 pontos diferentes nos ímãs de NeFB, medindo Ø 60 mm X 20 mm para serem medidas as intensidades de campo em cada um, nas duas faces dos ímãs. B- Vista em perspectiva tridimensional do ímã.

Fonte: Desidério (2017).

A ponta do sensor na sua parte lisa foi colocada em cada ponto e foi medida a intensidade do campo magnético naquele ponto cf. Fig. 6.

Figura 6 – A- Processo de medição da intensidade de fluxo magnético em pontos diferentes da face do ímã.

B- Medidor teslameter (PHYWE, Alemanha) apresentando o valor da intensidade do CM.

Fonte: Desidério (2017).

Os resultados das medições estão em miliTesla, abaixo na Tabela 2:

Tabela 2 – Resultado das medições em 9 pontos diferentes dos ímas de NeFB, medindo Ø60 mm X 20 mm, com a média dos valores e o desvio padrão.

1 – média geral: 378,2			
SUL		NORTE (-)	
a	394	J	397
b	391	k	400
c	398	l	398
d	393	m	389
e	366	n	384
f	372	o	372
g	378	p	375
h	390	q	385
i centro	294	r centro	332
desv.	32,3	desv.	21,0
média	375,1	média	381,3

2 – média geral: 375,05			
SUL		NORTE (-)	
a	387	j	398
b	396	k	381
c	387	l	385
d	392	m	386
e	375	n	382
f	364	o	356
g	379	p	387
h	396	q	392
i centro	334	r centro	274
desv.	19,8	desv.	38,2
média	378,9	média	371,2

3 – média geral: 378,5			
SUL		NORTE (-)	
a	408	j	371
b	398	k	396
c	389	l	407
d	397	m	402
e	379	n	367
f	375	o	339
g	381	p	392
h	395	q	406
i centro	332	r centro	279
desv.	22,1	desv.	41,8
média	383,8	média	373,2

4 - média geral: 378			
SUL		NORTE (-)	
a	399	j	403
b	411	k	400
c	404	l	386
d	383	m	385
e	367	n	382
f	379	o	382
g	381	p	373
h	389	q	387
i centro	335	r centro	258
desv.	22,6	desv.	44,1
média	383,1	média	372,9

5 – média geral: 378,95			
SUL		NORTE (-)	
a	430	j	392
b	397	k	381
c	394	l	394
d	393	m	391
e	379	n	369
f	366	o	368
g	382	p	390
h	399	q	400
i centro	337	r centro	259
desv.	25,5	desv.	43,6
média	386,3	média	371,6

6 – média geral: 379,2			
SUL		NORTE (-)	
a	401	j	385
b	404	k	381
c	398	l	398
d	396	m	391
e	383	n	372
f	375	o	367
g	382	p	385
h	394	q	386
i centro	328	r centro	299
desv.	23,3	desv.	29,5
média	384,6	média	373,8

Fonte: Desidério (2017).

Esta medição foi útil para determinar a posição dos ímãs (de 1 a 6) no novo dispositivo gerador de campos magnéticos. A partir das médias e dos desvios padrão, procurou-se colocar frente a frente os ímãs com valores de campo semelhantes, para que a compensação dos campos fosse mais simétrica tanto quanto possível. O dispositivo possui a forma de um cubo planificado quando aberto e um cubo propriamente dito quando fechado conforme o diagrama 6:

Diagrama 6 – A- Posição dos ímãs no novo dispositivo gerador de campos magnéticos, aberto. B- Diagrama que representa o dispositivo fechado.

Fonte: Desidério (2017).

Outras correções foram feitas além da troca das travas por parafusos. Constatou-se que seria necessário produzir mais garras para segurar os ímãs em seus lugares e também mudar completamente o sistema de fechamento, trocando as cantoneiras fixas por dobradiças, favorecendo a segurança e a usabilidade (Fig. 7).

Figura 7 – A e B- Construção e montagem do novo dispositivo. As marcações referem-se às travas e cantoneiras fixas que tiveram que ser removidas e substituídas por parafusos e dobradiças. C e D- Como ficaram as correções no dispositivo e o dispositivo pronto para ser utilizado.

Fonte: Desidério (2017).

Posteriormente, realizou-se uma segunda simulação computacional (Fig. 10) com os valores das medidas magnéticas reais dos ímãs. Esta simulação objetivou a visualização da simetria ou assimetria da compensação dos campos magnéticos, pois os valores das medidas de intensidade de campo não são sempre iguais na realidade, diferente da situação ideal dos ímãs com valores iguais utilizados na simulação anterior (Fig. 4C).

4.7. Simulações magnéticas para o Campo Magnético

Compensado:

De acordo com a tabela de valores de intensidade magnética, duas simulações com o *software* Vizimag (BEETESON, 2009) foram realizadas. Este *software* produz simulações magnéticas de acordo com as leis e cálculos do magnetismo, baseadas em medidas ou valores dados em um determinado sistema. A margem de precisão do *software* é de 10%. Uma simulação com valores ideais (a média de todas as médias gerais dos ímãs = 377,98 – considerado o valor aproximado 378 mT - miliTesla) e outra com os valores reais de cada ímã (ou seja, a média de todos os valores das 2 faces; Norte e Sul – de cada ímã), cf. Tabela 2.

Hipoteticamente, por mais que houvesse uma variação real na intensidade magnética em torno de aproximadamente 10% (variação garantida pelo fornecedor), a anulação das forças possibilita a formação simétrica de uma região aproximadamente esférica de campos magnéticos compensados, onde se criaria uma “Câmara de Campos Compensados” (CCC), de tamanho suficiente ($\approx \varnothing 40\text{mm}$) para caber uma placa de cultura com 40 mm de diâmetro, conforme o diagrama 7. Isto não seria verdadeiro se a variação de intensidade de um ou mais ímãs fosse muito grande. Assume-se um formato esférico devido à imagem circular formada no centro da simulação computacional.

Diagrama 7 – Posição da região esférica de campos compensados no centro do dispositivo ($\approx \varnothing 40\text{ mm}$ e $V=33\times 10^3\text{ mm}^3$). A cultura celular é realizada em seu interior.

Fonte: Desidério (2017).

Foram realizadas duas simulações para verificar a hipótese. Como o *software* Vizimag (BEETESON, 2009) somente mostra um recorte bidimensional circular do campo projetado em um plano, a posição escolhida para a visualização da forma da CCC foi a lateral esquerda (Figuras 8, 9, 10 e Diagrama 8).

Figura 8 – Imagem mostrando o diagrama 5 de forma tridimensional com o posicionamento dos ímãs.

Fonte: Desidério (2017).

Diagrama 8 – Plano de corte bidimensional que é simulado para ser visualizada a atuação e a forma geométrica dos campos magnéticos por meio do *software* Vizimag (BEETESON, 2009).

Fonte: Desidério (2017).

Figura 9 – Simulação magnética com os ímãs 1, 6, 2, 5. Valores ideais (média geral de todas as intensidades magnéticas ≈ 378 mT).

Fonte: Desidério (2017).

Figura 10 – Simulação magnética com os ímãs 1, 6, 2, 5. Valores reais em mT (conforme a média das faces Norte e Sul de cada ímã (cf. Tab. 2).

Fonte: Desidério (2017).

Notou-se que a diferença não foi relevante, ou seja, as imagens parecem as mesmas. Principalmente no centro do desenho, que mostra a efetiva compensação dos campos magnéticos (o campo magnético tende a zero na região onde foram posicionadas as amostras), formando uma região aproximadamente esférica. Isto ocorre devido às leituras magnéticas terem sido muito próximas, com desvio padrão também próximo; como descrito na Tabela 2.

Além da simulação, também foi calculado o volume da região esférica da CCC, com a seguinte fórmula:

$$V = \frac{4 \times \pi \times R^3}{3} \quad (1)$$

Sendo R o raio da esfera, tem-se, pelas imagens da simulação (Fig. 10), baseadas no tamanho e intensidade dos ímãs, que o raio da região esférica de anulação das forças magnéticas (CCC) é de 20 mm. Portanto o volume da região da CCC é $V = 33 \times 10^3 \text{ mm}^3$.

De acordo com a escala geométrica dos ímãs e seguindo o resultado da simulação, tem-se que as linhas de força do campo magnético atuam até 5 cm de distância além dos ímãs. Portanto, foi de suma importância que quaisquer outras culturas fossem colocadas a um raio de 15 cm de distância das faces do DGCMEC (com grande margem de segurança ao redor do aparelho), para evitar que fossem influenciadas. Esta precaução foi tomada desde o primeiro experimento com o Compensador de Campos Magnéticos (CCM), no início do trabalho de pesquisa. O Dispositivo (DGCMEC) foi posicionado no lado direito e ao fundo da estufa (podendo variar à esquerda ou à direita) (Fig. 11).

Figura 11 – Posições dos dispositivos magnéticos dentro da estufa. A- Compensador de Campos Magnéticos (CCM) e B- Dispositivo Gerador de Campos Magnéticos Estático e Compensado (DGCMEC).

Fonte: Desidério (2017).

4.8. Simulações magnéticas para o Campo Magnético

Estático:

Para a fase de experimentos com Campo Magnético Estático, apenas dois ímãs foram necessários. Porém suas faces deveriam ser contrapostas (N-S) de modo a ser criado um Campo Magnético Estático. Conforme o Diagrama 9, foram retirados os ímãs 1, 3, 4 e 6, deixando apenas os ímãs 5 (no topo com o polo Sul para baixo) e 2 (na base com o polo Norte para cima).

Diagrama 9 – A- Diagrama da posição dos ímãs para a formação do Campo Magnético Estático. B- Desenho esquemático da região cilíndrica de atuação do CME. Medidas retiradas dentro da área reservada para a placa de cultura Ø40 mm. A cultura celular é realizada em seu interior, na região central (representação da placa de cultura em corte). O plano de corte mostra o ponto de vista da simulação magnética.

Fonte: Desidério (2017).

Neste esquema de montagem foi realizada a simulação computacional para verificar qual seria a geometria do CME, a medida da intensidade do CM simuladas no centro (a 30 mm da face do ímã) e laterais (a aproximadamente 20 mm de raio a partir do centro) e novas medições experimentais nas mesmas posições com o Gaussímetro (teslameter PHYWE, Alemanha), para confirmar a simulação de acordo com as figuras 12 e 13.

Figura 12 – A e B- Simulação magnética com os ímãs 2 e 5 em plano de corte frontal. Valores médios das faces Norte e Sul de cada ímã (cf. Tab. 2). A- Medição ao centro. B- Medição na lateral esquerda.

Fonte: Desidério (2017).

Pode-se notar pela simulação computacional com o *software* Vizimag (BEETESON, 2009), que a geometria do CME é bem diferente da geometria do CMC. Nota-se também que o valor da intensidade de fluxo no centro, onde a cultura é submetida ao campo é aproximadamente a metade do valor médio do ímã. Pelo *software* de simulação (Fig. 12) ao

se colocar o cursor no centro observou-se uma intensidade de 0,181 Tesla (181 mT). Ao se colocar o cursor na lateral (esquerda ou direita) obteve-se uma medição de intensidade magnética de 0,149 Tesla (149 mT).

Após estas simulações realizou-se a medição do campo magnético no interior do dispositivo magnético. Foi observado que as simulações estavam bem próximas das medições conforme a Figura 13.

Figura 13 – Medição magnética da intensidade dos ímãs 2 e 5 interagindo entre si. Valores em miliTesla. A- Medida ao centro (180,5 mT) e B- Medida à esquerda (150,0 mT).

Fonte: Desidério (2017).

Pelas simulações e pela medição, nota-se que a cultura não está submetida a um campo uniforme, devido à natureza do ímã permanente. Os valores de intensidade do Campo Magnético Estático encontrados na região central foram de $\approx 180,5$ mT e na lateral $\approx 150,0$ mT. Em média, um valor de $\approx 165 \pm 15$ mT, sendo classificado como um campo de intensidade moderada (ROSEN, 2003).

Para o *design* experimental com CMC, pelo fato dos campos magnéticos serem anulados em um gradiente tendendo a 0 mT em alguma região do centro geométrico de uma esfera com 20 mm de raio, para todos os efeitos, este campo foi considerado como um CME fraco, estando abaixo de 1 mT na região do tratamento das células. É possível notar na simulação magnética na figura 14A, os pontos formando uma parábola com a concavidade voltada para cima, demonstrando uma redução gradativa na densidade de fluxo magnético (intensidade do campo) calculada pela simulação ao longo da linha vermelha traçada na figura 14B, ao longo da linha central de 40 mm, no círculo. Com todos os ímãs possuindo um valor de intensidade de campo ideal médio igual a 378 mT como parâmetro inicial da simulação, ao

se traçar a curva de medições, o ponto de intensidade mínima tem um valor de 0,0283 mT, ao se colocar a ponta do mouse nas coordenadas X:0,00 e Y:0,00, mostrando uma tendência a 0 mT na região em torno do centro geométrico da CCC. Contudo, limitações tanto no *software* de simulação (margem de precisão de 10%) quanto na medição experimental impedem a constatação da anulação completa do campo.

Figura 14 – Simulação magnética da anulação do CM na disposição dos ímãs para o CMC. A- Parábola mostrando a magnitude da densidade de fluxo medida em Tesla em função do diâmetro de 40 mm marcado em vermelho (14B). O valor mínimo mostrado na seta vermelha é 0,0283 mT. B- Simulação da anulação do Campo Magnético com linha demarcando o diâmetro de onde foram calculados os valores (pontos) da figura 14A. Parâmetros iniciais para todos os ímãs: 378 mT de intensidade de campo (densidade de fluxo).

Fonte: Desidério (2017).

4.9. Protocolos utilizados nos experimentos com as células-tronco

Os protocolos utilizados envolveram 2 tipos de experimentos para o Campo Magnético Compensado (CMC) e Campo Magnético Estático (CME), a saber:

a) Contagem manual de células marcadas por Azul de Tripán (n=5 para 4 períodos: 24 h, 48 h, 72 h, 96 h sob CMC e n=3 para 24 h sob CME);

b) Análise Proteômica por Espectrometria de Massas (n=3 para 2 períodos: 24 h e 96 h sob CMC).

Todos os experimentos foram feitos com células mesenquimais indiferenciadas extraídas da medula óssea de camundongos A/J (MSC-A/J), utilizadas nas passagens de 9 a 11. As técnicas de cultivo celular foram adaptadas às necessidades do *design* experimental a partir de Freshney (2010).

Por terem sido pilotos, os experimentos realizados com o “Compensador de Campos Magnéticos” (dispositivo protótipo) não foram descritos. Apenas os experimentos e protocolos finais com o “Dispositivo Gerador de Campos Magnéticos e Estáticos” foram descritos abaixo.

4.9.1. Contagem celular manual com marcação por azul de Tripán - Plaqueamento:

4.9.1.1. *Tripsinização:* Após o cultivo de células até a subconfluência em garrafas de cultura T25, lavagem com 1 ml de tampão fosfato-salino (PBS - *Phosphate Buffered Saline*), houve a tripsinização com 1 ml de tripsina EDTA (Gibco), por 3 minutos em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 100% de umidade. Procedeu-se à desagregação mecânica e desativou-se a tripsina com 1 ml de meio de cultura α MEM + 10% SFB e o conteúdo da garrafa foi pipetado em um tubo *falcon* de 15 ml. Depois da centrifugação do tubo por 5 min, 4°C e 1.200 RPM, o conteúdo foi descartado e ressuspensionado em 1 ml de meio de cultura com 10% SFB.

4.9.1.2. *Contagem celular inicial:* Em um microtubo *Eppendorf* de 2 ml, foram pipetados 90 μ l de azul de tripan, mais 10 μ l das células ressuspensionadas anteriormente, perfazendo um total de 100 μ l (diluição das células em 10X de azul de tripan). Foram homogeneizados fazendo *up/down*. Deste microtubo

foram retiradas 2 gotas de 10 µl, pipetando primeiro uma gota em cada compartimento da câmara de *Neubauer*, e depois colocando a lamínula por cima com cuidado para não formar bolhas. Procedeu-se à contagem manual sob microscópio invertido e a partir do valor da contagem, calculou-se o volume correspondente a 10^5 células a serem plaqueadas em cada placa (controle e tratamento), utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$N = \frac{Cn \times D \times 10^4 \times Rv}{Qn} \quad (2)$$

Onde:

N = Número total de células

Cn = Número de células contadas

Qn = Número de quadrantes contados

D = diluição

10^4 = constante da fórmula

Rv = Volume ressuspendido

Em seguida:

$$Pv = \frac{(Rv \times Cp)}{N} \quad (3)$$

Onde:

Pv = Volume a ser plaqueado

Cp = Quantidade células a serem plaqueadas

4.9.1.3. Cálculo da taxa de Viabilidade celular: Também durante a contagem, foi anotado separadamente o número de células marcadas com azul de tripan (mortas). A diluição tem como objetivo diferenciar as células vivas das mortas (pelo rompimento da membrana celular, a substância azul de tripan penetra no interior da célula, indicando a morte celular), bem como fazer o cálculo das porcentagens de mortalidade e viabilidade conforme as seguintes fórmulas:

$$Ct = Cn + Cm \quad (4)$$

Onde:

Ct = Número total de células contadas (marcadas e não marcadas)

Cn = Número de células contadas

Cm = Número de células marcadas contadas

Em seguida:

$$Mp = \frac{(Cm \times 100)}{Ct} \quad (5)$$

Onde:

Mp = Porcentagem (taxa) de Mortalidade celular

Depois:

$$Vp = 100 - Mp \quad (6)$$

Onde:

Vp = Porcentagem (taxa) de Viabilidade celular

- 4.9.1.4. *Plaqueamento:*** Duas placas de cultura de Ø40 mm foram identificadas como 1C - Controle e outra como o 2T - Tratamento, o código do experimento e o tempo de cultivo a serem submetidas. Foram pipetados 2 ml de meio de cultura αMEM + 10% SFB em cada placa. Depois foi pipetado o volume correspondente a 10^5 células (plaqueamento). A amostra 2T – Tratamento foi colocada dentro da CCC do DGCMEC e os parafusos superiores foram apertados, fechando-se o dispositivo e anotada a hora do plaqueamento. Após isto as duas amostras (1C e 2T) foram colocadas em estufa de cultura a 37°C, 5% de CO₂ e 100% de umidade, pelo tempo de cultura necessário (24h, 48h, 72h, 96h).
- 4.9.1.5. *Contagem Tempo 0 (T0):*** Esta contagem visa a conferir se o valor que está sendo pipetado corresponde aproximadamente a 10^5 , servindo como parâmetro inicial da curva de crescimento para se avaliar a proliferação. Em um microtubo *Eppendorf* de 2 ml, foi pipetado 1 ml de meio de cultura α MEM + 10% SFB. Deste volume (1 ml), foi retirado o volume calculado previamente e plaqueado (*Pv*). Depois foi pipetado exatamente o mesmo volume em células dentro do microtubo novamente, perfazendo um total de 1 ml. Da mesma forma, procedeu-se à contagem manual, sem diluição com marcação por azul de tripan (utiliza-se a mesma fórmula de contagem manual, mas sem a diluição – *D*).
-

4.9.2. Contagem celular manual com marcação por azul de Tripán - Coleta:

Para a coleta, foram retiradas as amostras de controle (1C) e tratamento (2T) da estufa e colocadas dentro da câmara de fluxo laminar. Depois foram desaparafusados os parafusos superiores do dispositivo magnético e retirada a cultura de células tratada (2T). Os sobrenadantes foram descartados e a cultura foi lavada com 1 ml de solução tampão PBS. Após isto as células foram tripsinizadas com 500 µl de tripsina (preferencialmente descongelada recentemente) em estufa por 3 min, a 37°C e 5% de CO₂. Procedeu-se à desagregação mecânica batendo com os dedos nas placas de cultura (em média, foram batidas 60 vezes ao redor de cada placa com o dedo indicador ou médio por meio de movimentos de piparote). Desativou-se a tripsina com 500 µl de meio de cultura (αMEM + 10% SFB) em cada placa. Foi pipetado mais 1 ml de meio de cultura e homogeneizado nas laterais e no centro das placas (*up/down*) produzindo um jato de meio de cultura, soltando as células remanescentes. Foi pipetado o conteúdo de cada placa em tubos *Falcon* de 15 ml previamente identificados como 1C e 2T. Centrifugados os tubos *Falcon* a 1.200 RPM, 20°C, por 5 min, foram descartados os sobrenadantes e ressuspensos os *pellets* em 500 µl de meio de cultura (para experimentos com o CMC; enquanto que para os experimentos com CME, os *pellets* foram ressuspensos em 1 ml, mudando os valores na fórmula de contagem). Em 2 microtubos as células foram diluídas 2X em azul de tripan (para um volume final arbitrário de 100 µl / 2 = 50 µl células + 50 µl tripan). Foram utilizados os procedimentos descritos nos itens 4.9.1.2 para determinação do número de células contadas e 4.9.1.3 para determinação da viabilidade celular, trocando os valores na fórmula onde for necessário. No caso dos experimentos com CMC, as células foram ressuspensas em 0,5 ml e depois o resultado foi dividido por 0,5 para se obter o valor de células por ml. No caso do tratamento com CME este procedimento matemático não foi necessário.

4.9.3. Ensaio de proliferação celular para Análise Proteômica - Plaqueamento

O procedimento para este ensaio foi o mesmo do item 4.9.1, com tripsinização, contagem manual, cálculo da taxa de viabilidade (opcional) e plaqueamento

(itens de 4.9.1.1 a 4.9.1.4), sendo desnecessário um cálculo da quantidade inicial plaqueada no T0, pois o resultado da análise proteômica não envolve necessariamente a quantidade final de células.

4.9.4. Ensaio de proliferação celular para Análise Proteômica – Coleta e extração proteica

Já a coleta difere dos outros métodos previamente utilizados. Foram retiradas as amostras (controle e tratamento) de dentro da estufa e a amostra do grupo experimental de dentro do Dispositivo Gerador de Campos Magnéticos, cessando o tratamento. Após serem descartados os meios de cultura das duas amostras, estas foram lavadas com 1 ml PBS.

Aplicaram-se 200 µl de tampão de lise (Uréia 7M e Thiuréia 2M em água) mais 10 mM de Ditiotretitol (DTT - Sigma) em cada placa e as amostras foram raspadas com o rodinho (*scraper*) para retirar as células. O conteúdo foi pipetado em microtubos estéreis de 2 ml devidamente identificados e congelado em freezer -80°C, para posterior preparo para análise proteômica.

4.9.5. Avaliação proteômica do lisado celular – Preparação da amostra para Análise Proteômica

Após os períodos de 24 h e 96 h de exposição das células ao campo compensado, o lisado total proteico foi obtido a partir do *pool* de 3 amostras individuais pela incubação das mesmas com o tampão contendo uréia 6M, thiouréia 2M em água acrescido de dithiothreitol (DTT) 100 mM em gelo por 10 min. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 15000 g, seguido da coleta do sobrenadante. A seguir, as amostras foram submetidas à troca de solução e concentração proteica no Amicon, utilizando solução de Bicarbonato de amônio (AMBIC) 50mM e uréia 3M sob centrifugação a 5000 RPM a 20°C. As amostras que ficaram retidas na membrana do Amicon foram transferidas para um novo microtubo.

A seguir, foi realizada a quantificação de proteínas totais para a diluição da amostra na concentração de 1 µg/µl. Os volumes contendo 50 µg de

proteínas foram então transferidos para um novo microtubo (*Azygen*) e 10 µl de AMBIC 50 mM foram adicionados à amostra seguido de 25 µl da solução *RapiGest* SF a 0,2% (Waters). A solução foi incubada em bloco aquecido (37°C) por 30 min seguido de agitação rápida. A seguir, foram adicionados 2,5 µl de DTT 100 mM, seguido de agitação de vórtex e incubação em bloco aquecido (37°C) por 60 min. Após a amostra ter resfriado à temperatura ambiente, 2,5 µl de iodoacetamida (IAA) 300 mM foram adicionados à amostra e incubada no escuro por 30 min. A digestão protéica foi realizada após a adição de tripsina (50 ng/µl) a 37°C *overnight*. Após a digestão, 10 µl de ácido trifluoroacético (TFA) a 5% foram adicionados, agitado em vórtex e incubado a 37°C por 90 min com o objetivo de hidrolisar o *RapiGest*. A amostra foi centrifugada a 14000 RPM por 30 min a 6°C e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo (*Waters Total Recovery vial*-Waters).

4.9.6. Análise por nanoUPLC acoplado a espectrometria de massas

As amostras foram analisadas em triplicata. Todos os experimentos foram realizados no sistema nanoACQUITY UPLC (Waters) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo QToF G2 (Waters). Inicialmente, foi realizada uma separação em nanoescala com o sistema UPLC nanoACQUITY equipado com uma coluna C₁₈ do tipo HSS T3 (Acquity UPLC HSS T3 *column* 2,1 mm×50 mm; 1,8 µm, Waters). A coluna foi pré-equilibrada com a fase móvel B (Acetonitrila contendo ácido fórmico 0,1%) e em seguida os peptídeos foram separados por gradiente linear de 7-85% de fase móvel B durante 70 min com fluxo de 0,4 µL/min e a temperatura da coluna foi mantida a 35°C. A análise de peptídeos tripticos foi realizada no espectrômetro de massas Xevo G2 QToF, operando no modo íon positivo, com o tempo de aquisição de dados de 70 min. Os dados obtidos foram processados através do *software ProteinLynx GlobalServer* (PLGS) versão 3.0 (Waters). A identificação das proteínas foi obtida através do algoritmo de contagem de íons incorporado ao *software*, que foi buscado no banco de dados da espécie *Mus musculus* baixado do catálogo do *UniProt* (*Universal Protein Resource*). As alterações quantitativas em níveis protéicos foram analisadas utilizando-se o *PLGS Expression E*, de

acordo com as intensidades de pico dos íons peptídicos medidos.

4.9.7. Quantificação livre de marcadores (“*label-free*”)

A quantificação livre de marcadores foi feita utilizando o *software ProteinLynx Global Service* (PLGS, v 2.2.5, Waters). Todas as proteínas identificadas com um *score* com confiança maior que 95% foram incluídas na análise quantitativa. Os peptídeos idênticos de cada triplicata por amostra foram agrupados com base na precisão de massa (< 10 ppm) e numa tolerância de tempo de retenção $< 0,25$ min, usando o *software* de agrupamento incluso no PLGS v. 2.3. Foi feita uma normalização usando a função de autonormalização do PLGS. A significância das razões de expressão relativa foi calculada usando o algoritmo Monte-Carlo e expressa como $p < 0,05$ para as proteínas sub-reguladas e $p > 0,95$ para as proteínas super-reguladas, respectivamente. Apenas proteínas identificadas em 2 das 3 corridas foram selecionadas para as análises subsequentes.

4.9.8. Análise Estatística

Para os experimentos de contagem manual de células, foram empregados os *softwares GraphPad InStat* versão 3.0 para *Windows* e *GraphPad Prism* versão 6.0 para *Windows* (*GraphPad Software Inc.*, La Jolla, CA, EUA). Inicialmente os dados foram checados em relação à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade (teste de Barlett), para seleção do teste estatístico apropriado (paramétrico ou não paramétrico). A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. Resultados e Discussão:

5.1. Construção do dispositivo para geração de CMC e CME

Como descrito no capítulo anterior, foi possível construir com sucesso um único dispositivo que produz dois tipos de campos magnéticos, a depender da disposição dos ímãs (CME e CMC). Este dispositivo poderá ser empregado em futuros estudos que visem a avaliar o efeito de campos magnéticos de intensidade fraca ou moderada sobre culturas celulares de diferentes tipos. Trata-se de um dispositivo com usabilidade facilitada, por conter poucos parafusos e ímãs em tamanho ideal para placas de cultivo celular de 40 mm de diâmetro. A maior limitação deste dispositivo, no entanto, reside na possibilidade de se fazer um único experimento por vez, já que só há espaço para inserção de uma placa de cultivo celular.

Para gerar o CMC, são necessários 6 ímãs, os quais devem ser colocados com cuidado para que não se aproximem entre si, pois podem atrair-se bruscamente, devido à alta força magnética. Os 6 ímãs situados ortogonalmente nos três eixos dimensionais, podem anular inclusive o campo magnético da Terra. A separação entre eles deve ser feita com uma placa de alumínio (15 X 20 cm) e os ímãs acondicionados individualmente, bem como as travas devem ser aparafusadas logo em seguida à colocação de cada ímã, com chave Allen de 6 mm. Devem ser observadas as medidas de segurança, como uso de luvas de couro, para evitar ferimentos.

No caso do CME, são necessários apenas 2 ímãs, os quais devem ser montados como descrito no capítulo anterior (Diag. 4B e item 4.8), seguindo as mesmas orientações para montagem do CMC (Diag. 4A e item 4.7).

5.2. Contagem celular manual com marcação por azul de Tripan - CMC

A Tabela 3 mostra o número de células contadas manualmente por método de marcação por azul de tripan após tratamento com o campo magnético compensado (2T) ou não (controle; 1C) por diferentes períodos de tempo e o gráfico 1, mostra as respectivas curvas de crescimento.

Tabela 3. Número de células contadas manualmente por método de marcação por azul de tripan após tratamento com o campo magnético compensado (2T) em diferentes períodos ou não (controle; 1C). n=5.

horas	Número de células/ml											
	E1		E2		E3		E4		E5		Média	
	1C	2T	1C	2T	1C	2T	1C	2T	1C	2T	1C	2T
0	103740	103740	101875	101875	127500	127500	136250	136250	128750	128750	119623	119623
24	305800	365840	147500	132500	165000	172500	265000	197500	257500	247500	228160	223168
48	395000	410000	327500	397500	508000	277500	215000	202500	150000	137500	319100	285000
72	362500	357500	212500	270000	202500	257500	202500	245000	303500	331250	256700	292250
96	382500	247500	740000	607500	355000	485000	217500	262500	1290000	720000	597000	464500

Fonte: Desidério (2017).

Gráfico 1 – Curva de proliferação celular da linhagem MSC-A/J nas passagens de 9 a 10. Quintuplicata de experimentos com Grupo Controle (1C) e Grupo Experimental (2T) tratado com Campo Magnético Compensado por diferentes períodos de tempo. Células por ml.

Fonte: Desidério (2017).

Os valores numéricos da contagem manual foram convertidos em porcentagem de proliferação com relação ao *baseline* (plaqueamento inicial de aproximadamente $10^5 = 100\%$) (Tab. 4). O gráfico 2 mostra a porcentagem média (barras indicam desvio-padrão). Os dados foram analisados utilizando o *GraphPad Prism* (versão 6.0 para *Windows*). Foi realizado o teste ANOVA a 2 critérios, seguido pelo teste de Sidak para comparações múltiplas. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($F=0,310$, $p=0,581$), mas sim entre os tempos ($F=7,703$, $p=0,0001$). A interação entre estes critérios não foi significativa ($F=0,329$, $p=0,857$). O teste de Sidak revelou diferença apenas entre o tempo de 0 h e o de 96

h; entre 24 h e 96 h e entre 72 h e 96 h para o grupo controle; e para o tratado, apenas entre 0 h e 96 h. A diferença encontrada nos tempos se dá naturalmente pela proliferação normal das células que aumenta em diferentes períodos.

Tabela 4. Porcentagem de proliferação de células mesenquimais de camundongos A/J tratadas por campo magnético compensado (2T) ou não (controle – 1C) durante diferentes períodos de tempo. n=5.

horas	Porcentagem de Proliferação													
	E1		E2		E3		E4		E5		Média		DP	
	1C	2T	1C	2T	1C	2T	1C	2T	1C	2T	1C	2T	1C	2T
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0
24	295	353	145	130	129	135	194	145	200	192	193	191	65	94
48	381	395	321	390	398	218	158	149	117	107	275	252	130	135
72	381	345	209	265	159	202	149	180	236	257	227	250	93	64
96	369	239	726	596	278	380	160	193	1002	559	507	393	348	182

Fonte: Desidério (2017).

Gráfico 2. Porcentagem média de proliferação de células MSC-A/J tratadas com o campo magnético compensado ou não (controle), em diferentes períodos experimentais. Barras indicam desvio-padrão. n=5. Células por ml.

Fonte: Desidério (2017).

A Tabela 5 mostra a porcentagem de viabilidade das células mesenquimais de camundongos A/J tratadas com o CMC por diferentes períodos de tempo. Os valores médios de porcentagem de viabilidade, bem como os desvios-padrão estão descritos no Gráfico 3. Os dados foram analisados por ANOVA a 2 critérios, seguida pelo teste de *Sidak* para comparações múltiplas. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos

($F=0,841$, $p=0,365$), mas sim entre os tempos ($F=12,88$, $p<0,0001$). A interação entre estes critérios não foi significativa ($F=0,119$, $p=0,975$). O teste de *Sidak* revelou, para o grupo controle, um aumento significativo na viabilidade para os tempos de 48, 72 e 96 h em relação ao *baseline*. Já para o grupo tratado com o campo compensado, a viabilidade celular foi significativamente maior para todos os tempos experimentais em relação ao *baseline*.

Tabela 5. Porcentagem de Viabilidade de células mesenquimais de camundongos A/J tratadas por campo magnético compensado durante diferentes períodos de tempo. $n=5$.

Viabilidade Celular (%)														
horas	E1		E2		E3		E4		E5		Média		DP	
	1C	2T	1C	2T	1C	2T	1C	2T	1C	2T	1C	2T	1C	2T
0	88,2	88,2	93,1	93,1	85,3	85,3	89,1	89,1	89,6	89,6	89,0	89,0	2,8	2,8
24	92,9	96,7	97,9	96,4	90,4	90,8	92,2	95,2	91,2	91,7	92,9	94,2	2,9	2,7
48	95,2	97,6	91,6	95,2	94,4	91,7	96,6	94,2	93,8	96,5	94,3	95,0	1,8	2,3
72	95,4	96,0	94,5	95,6	92,0	91,9	91,0	93,3	95,6	94,5	93,7	94,3	2,1	1,7
96	94,5	94,3	96,7	98,4	93,4	97,0	95,6	96,3	96,1	94,7	95,3	96,1	1,3	1,7

Fonte: Desidério (2017).

Gráfico 3. Viabilidade de células mesenquimais (MSC-A/J) em porcentagem para o Grupo Controle e Grupo Experimental em cinco períodos, com tratamento por Campo Magnético Compensado. As barras indicam desvio-padrão ($n=5$).

Fonte: Desidério (2017).

Nenhum trabalho foi encontrado utilizando o mesmo *design* experimental desta pesquisa. Portanto decidiu-se considerar o CMC aqui utilizado como um tipo de CME de baixíssima intensidade tendendo a 0 (CM fraco < 1 mT, c.f. Rosen, (2003)). Alguns poucos trabalhos utilizam outros tipos de CMs de baixa intensidade, que, após uma seleção foram utilizados como parâmetro de comparação com este estudo (focando na proliferação, viabilidade e proteômica). Foi adotado o critério da baixa intensidade magnética apenas, independente se foram utilizados CMEs, Campos Eletromagnéticos (CEMs), oscilatórios, pulsados ou não. Sabe-se que os efeitos biológicos da exposição a CMs variam conforme a intensidade magnética, o tipo, estágio e densidade celulares, temperatura, tempo de exposição, entre outros fatores, de maneira dependente (ZHANG et al., 2017; DINI; ABBRO, 2005; ROSEN, 2003).

Há uma ampla adaptação à baixa intensidade do CM da Terra (geomagnético) a que todos os seres vivos estão submetidos, que pode variar entre 0,024 mT a 0,07 mT a depender da latitude e longitude onde são medidos (BRANCO, 2015); estes valores poderiam ser considerados como parâmetros de “normalidade”. O CMC utilizado está abaixo deste parâmetro.

A seguir, uma lista dos efeitos biológicos causados por CMs ou CEMs de baixa intensidade (< 1 mT):

- a) humanos expostos a CMs de intensidades entre 0,1 mT e 0,5 mT (FRANÇA et al., 2005):
 - alterações no metabolismo do cálcio e suspeitas da supressão da produção de melatonina.
 - b) células tumorais expostas a CMBF (50Hz) e intensidade de 100 μ T (0,1 mT) (TRILLO et al., 2012; FEDROWITZ et al., 2002; THUN-BATTERSBY et al., 1999):
 - aumento da proliferação celular.
 - c) Dini e Abbro (2005) citam alguns trabalhos com efeitos biológicos para CMs fracos (< 1 mT) em geral:
 - em bactérias *E. Coli* foram observadas mudanças na conformação da cromatina, expostas a campos AC/DC (BELYAEV et al. 1997);
 - em fibroblastos e linfócitos humanos, bem como em *E. Coli*, os CMs fracos induzem uma viscosidade tempo-dependente anômala (BINHI et al., 2001; BELYAEV et al. 1994);
-

- alterações nas funções neuronais e comportamentais (KAVALIERS; OSSENKOPP, 1994; REITER, 1993; THOMAS et al., 1986);
- podem influenciar funções cerebrais e aumentar o efluxo de íons de Ca^{2+} (VOROBYOV et al., 1998; BLACKMAN et al., 1985).

Abaixo, seguem os efeitos biológicos em células-tronco e outras, à exposição a Campos Eletromagnéticos sinusoidais, pulsados ou contínuos de baixa intensidade (< 1 mT) e frequência (7 Hz – 30 Hz) associados a CMEs de intensidade da ordem de 10 μT a 130 μT (0,01 mT a 0,13 mT) citados por Maziarz et al. (2016):

- d) em células-tronco cardíacas (CSCs) submetidas a campos de 0,01 mT (GAETANI et al., 2009):
 - aumento da atividade metabólica;
 - aumento na taxa de proliferação;
 - aumento na expressão de marcadores cardíacos: *Troponin I* (TnI), *myosin heavy chain* (MHC), *NK2 transcription factor related, locus 5* (Nkx2.5);
 - diminuição na smooth muscle actin (SMA) ou nenhuma mudança na expressão de marcadores vasculares: *Vascular Endothelial growth factor* (VEGF), *Kinase Domain Receptor* (KDR);
 - alterações na distribuição de Ca^{2+} intracelular.
 - e) em CSCs e células-tronco mesenquimais de modula óssea (BM-MSCs) submetidas a campos de 0,01 mT (LISI et al., 2008):
 - super-regulação de marcadores cardíacos: TnI, MHC;
 - sub-regulação de marcadores angiogênicos: VEGF, KDR;
 - aumento na expressão de marcadores osteogênicos: *Alkaline Phosphatase* (ALP), *Osteocalcin* (OC), *Osteopontin* (OP);
 - alterações na morfologia da membrana plasmática.
 - f) em BM-MSCs submetidas a campos de 0,13 mT (TSAI et al., 2009):
 - alterações tempo-dependentes na taxa de proliferação celular;
 - estimulação da ALP no sétimo dia;
 - aprimoramento da expressão precoce de genes osteogênicos: *Runt-related transcription factor* (Runx2/Cbfa1) e ALP, durante o estágio médio da diferenciação osteogênica.
 - g) em BM-MSCs submetidas a campos de 0,1 mT (JANSEN et al., 2010):
 - aumento na mineralização da matriz;
-

- sem efeito na atividade da ALP;
 - super-regulação de vários genes marcadores osteogênicos: Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2), Osteocalcin (OC), Osteoprotegerin (OPG), Bone Sialoprotein (IBSP), Matrix Metalloproteinase-1 e 3 (MMP-1, MMP-3);
 - estimulação da diferenciação osteogênica.
- h) em BM-MSCs e células tipo-osteoblasto submetidas a campo de 0,1 mT (KAIVOSOJA et al., 2015):
- aumento na viabilidade celular;
 - sem efeito na osteo-indução.
- i) em BM-MSCs e condrócitos submetidas a campo de 0,035 mT (WALTHER et al., 2007):
- impacto no metabolismo e na estrutura da matriz celulares;
 - sem aumento na expressão de genes relacionados ao câncer.

No presente trabalho, para o tratamento com CMC, houve uma tendência à redução da proliferação celular, apesar de não ter sido estatisticamente significativo. Este resultado não corrobora os achados de Trillo et al. (2012); Fedrowitz et al. (2002); Thun-Battersby et al. (1999); Gaetani et al. (2009), provavelmente por conta de diferenças no *design* experimental e/ou pelo tipo celular utilizado.

A viabilidade foi aumentada no grupo controle em 48h, 72h e 96h em relação ao *baseline*. Para o grupo tratado a viabilidade celular foi maior para todos os tempos experimentais em relação ao *baseline*, mas não entre os grupos controle e tratamento. O aumento na taxa de viabilidade celular é um resultado que corrobora os achados de Kaivosoja et al. (2015).

Ressalta-se que o CMC foi apenas comparado a um CM de baixa intensidade, sem o que a comparação não seria possível. Porém a região onde as células foram tratadas possuía um campo com tendência a zero.

5.3. Contagem celular manual com marcação por azul de Tripan: - CME

A Tabela 6 mostra o número de células contadas manualmente por método de marcação por azul de tripan após tratamento com o campo magnético estático (2T) ou não (controle; 1C) por 24 h e o gráfico 4, mostra o respectivo padrão de crescimento.

Tabela 6. Número de células contadas manualmente por método de marcação por azul de tripan após tratamento com o campo magnético estático (T) em diferentes períodos ou não (controle; C). n=3.

horas	Número de células (cells/ml)							
	E1		E2		E3		Média	
	1C	2T	1C	2T	1C	2T	1C	2T
0	105000	105000	117500	117500	113750	113750	112083	112083
24	247500	222500	130000	100000	140000	85000	172500	135833

Fonte: Desidério (2017).

Gráfico 4. Proliferação de células mesenquimais (MSC-A/J) para o Grupo Controle e Grupo Experimental em 24h, com tratamento por Campo Magnético Estático. Células por ml. n=3

Fonte: Desidério (2017).

Os valores numéricos da contagem manual foram convertidos em porcentagem de proliferação com relação ao *baseline* (plaqueamento inicial de aproximadamente $10^5 = 100\%$) (Tabela 7). O gráfico 5 mostra a porcentagem média (barras indicam desvio-padrão). Os dados de proliferação após 24 horas foram analisados pelo teste de t pareado ($p < 0,05$). A porcentagem média de proliferação ($\pm EP$) em relação ao *baseline* (considerado como 100%)

para o grupo controle foi de $157 \pm 39\%$ e para o grupo tratado foi de $124 \pm 44\%$. A diferença entre os grupos não foi significativa ($t=4,25$, $p=0,051$).

Tabela 7. Porcentagem de proliferação de células mesenquimais de camundongos A/J tratadas por campo magnético estático durante 24 h. $n=3$.

Porcentagem de Proliferação										
horas	E1		E2		E3		Média		DP	
	1C	2T	1C	2T	1C	2T	1C	2T	1C	2T
0	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0
24	236	212	111	85	123	75	157	124	39	44

Fonte: Desidério (2017).

Gráfico 5. Porcentagem média de proliferação de células MSC-A/J tratadas com o Campo Magnético Estático (2T) ou não (1C) no tempo de 24 h. Barras indicam desvio-padrão. $n=3$.

Fonte: Desidério (2017).

A Tabela 8 mostra a porcentagem de viabilidade das células mesenquimais de camundongos A/J tratadas com o CME por 24 h. Os valores médios de porcentagem de viabilidade, bem como os desvios-padrão estão descritos no Gráfico 6. Os dados foram analisados pelo teste t pareado. A porcentagem média de viabilidade ($\pm EP$) em 24 horas para o grupo controle foi de $93\% (\pm 4\%)$ e para o tratado foi de $87\% (\pm 4\%)$. A diferença entre os grupos não foi significativa ($t=1,03$, $p=0,41$).

Pelo fato de não ter sido encontrada diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados para este campo, provavelmente por conta do tamanho da amostra e do tempo experimental, não foi realizada análise proteômica.

Tabela 8. Porcentagem de Viabilidade de células contadas manualmente por método de marcação por azul de tripan. N=3.

horas	Viabilidade Celular (%)									
	E1		E2		E3		Média		DP	
	1C	2T	1C	2T	1C	2T	1C	2T	1C	2T
0	92,6	92,6	71,2	71,2	92,6	92,6	85,5	85,5	12,4	12,4
24	90,8	94,7	88,2	81,6	100,0	85,0	93,0	87,0	4,0	4,0

Fonte: Desidério (2017).

Gráfico 6. Viabilidade (24 h) de células mesenquimais (MSC-A/J) em porcentagem para o Grupo Controle (1C) e Grupo Experimental (2T), com tratamento por Campo Magnético Estático. As barras indicam desvio-padrão (n=3).

Fonte: Desidério (2017).

Para CMEs de intensidade moderada (1 mT a 1.000 mT) a literatura é mais ampla e abrangente. Dentre os trabalhos citados destacam-se os seguintes efeitos:

- a) em camundongos *in vivo* e células *in vitro*, submetidos a CMEs e CM sinusoidal (50Hz) a partir de 10 mT (BEKHITE, et. al, 2016; SAITO; SUZUKI; SUZUKI, 2006):
 - alterações teratológicas;
 - diminuição de marcadores vasculares e da expressão da proteína VEGF;
 - aumento das espécies reativas de oxigênio;
 - aumento de apoptose.
- b) em coelhos submetidos a CME de 20 mT; ratos e camundongos submetidos a CME de 50 a 600 mT; gatos submetidos a CME de 120 mT (HONG et al., 1988;

NAKAGAWA; MATSUDA, 1988; ROSEN; LUBOWSKY, 1987; KLIMOVSKAYA; SMIRNOVA, 1976; KHOLODOV, 1974) citados por Rosen, (2003):

- alterações no eletroencefalograma;
 - mudanças no potencial evocado somatosensório e visual;
 - mudanças no comportamento operante;
 - sem efeitos persistentes sobre a habilidade de aprendizagem.
- c) em seres humanos submetidos a CMs de 0,5 a 50 mT (FRANÇA et al., 2005):
- mudanças na latência de respostas em testes complexos de raciocínio;
 - sensações visuais oscilatórias (fosfenos magnéticos);
 - excitabilidade do sistema nervoso central;
 - fibrilações cardíacas.
- d) em células de câncer humano (HL-60, SK-Hep-1) submetidas a CMBF (50 Hz) de 20 mT (HUANG et al., 2006):
- inibição do crescimento celular;
 - aumento da concentração de íons de sódio (Na^+) e potássio (K^+);
 - aumento da osmolaridade em células sobrenadantes.
- e) em BM-MSCs submetidas a CME de 4 a 15 mT (JOUNI et al. 2013):
- diminuição na taxa de proliferação e viabilidade celulares.
- f) em osteoblastos submetidos a CME de 3,9 mT (WANG et al., 2012):
- aumento da proliferação;
 - maturação e mineralização.
- g) em sete linhagens celulares cancerígenas humanas, cinco linhagens não-cancerígenas humanas e duas linhagens celulares não-cancerígenas de roedores submetidas a CMEs de 1T (ZHANG et al., 2017):
- em densidades celulares baixas, sem impacto no ciclo ou morte celulares;
 - em altas densidades celulares, redução do número de células cancerígenas;
 - aumento ou nenhum efeito sobre a proliferação celular.
- h) em células-tronco do tecido adiposo humano (hASC) submetidas a CME 500 mT (MAREĐZIAK et al., 2017):
- aumento de viabilidade (bloqueado após administração de inibidor da PI3K);
 - alterações na proliferação celular.
- i) em células-tronco do tecido adiposo de ratos (ASC) submetidas a CME 500 mT
-

(WANG et al., 2016):

- redução na proliferação e viabilidade;
- inibição de antígenos de superfície (CD49d, CD54, CD73);
- sub-regulação da expressão de citocinas;
- sub-regulação da expressão de marcadores genéticos de célula-tronco;
- inibição da diferenciação adipogênica e osteogênica;
- sem danos à integridade do DNA.

j) em células-tronco da polpa dental (DPSCs) submetidas a CME de 400 mT (LEW, et al., 2016):

- aumento na taxa de proliferação celular;
- aumento no valor de anisotropia;
- ativação de íons de Ca^{2+} intracelular;
- aumento na taxa de actina F/G;
- alteração nas membranas celulares.

k) em DPSCs submetidas a CMEs de 400 ou 800 mT (LIN, et al., 2015):

- aumento das taxas de sobrevivência celular após descongelamento;
- aumento da anisotropia na região hidrofílica;
- melhora na estabilidade e resistência da membrana celular a danos causados por cristais de gelo;
- melhora na criopreservação livre de DMSO.

l) em células mesenquimais da medula óssea de humanos (BMSCs) submetidas a CME de 400 mT (AMIN, et al., 2014):

- secreção do fator de crescimento de transformação (TGF)- β 3;
- diferenciação condrogênica associada à presença do (TGF)- β 3;

Resumo dos maiores efeitos biológicos em células, sendo a maioria dependentes do tempo de exposição e tipo celular, dos CMEs moderados de acordo com Dinni e Abbro, 2005:

m) membrana plasmática:

- reorientação dos domínios moleculares diamagnéticos;
- mudanças nos padrões proteicos;
- rotação dos fosfolípidios da membrana;
- rearranjo dos sítios de ligação da lectina;

n) $[\text{Ca}^{2+}]_i$:

- fluxos intra e extracelulares;
-

- transporte através da membrana celular;
- sinalização.
- o) morfologia celular:
 - alongamento para células cultivadas em suspensão;
 - destacamento de células aderidas em cultivo;
 - microvilosidades lamelares ou tipo-bolha.
- p) citoesqueleto:
 - reorganização e quebra dos filamentos da F-Actina e microtúbulos.
- q) proliferação:
 - perturbação no índice proliferativo (aumento ou diminuição).
- r) apoptose:
 - perturbação da taxa apoptótica (aumento ou diminuição).
- s) genes relacionados à apoptose:
 - modulação (aumento ou diminuição).
- t) superfície celular apoptótica:
 - reversão parcial da expressão de epitopos “coma-me”.
- u) necrose:
 - não induzida.
- v) fagocitose de células apoptóticas:
 - diminuição.
- w) diferenciação de macrófagos:
 - atraso.

Neste *design* experimental, houve uma tendência à redução da proliferação, contudo, sem significância estatística. Neste sentido, se esta tendência, caso confirmada por um número maior de experimentos ou do tempo de exposição ao CME, poderia corroborar os achados de Zhang et al., 2017, Wang, et al., 2016, Jouni et al. (2013), Huang et al. (2006), mas não corrobora os resultados de Zhang et al. (2017), Lew et al. (2016), Wang et al. (2012), provavelmente pelo tipo celular utilizado nos experimentos, bem como pelas diferenças no *design* experimental.

Para a viabilidade, também ocorreu uma tendência à diminuição da taxa, porém não significativa estatisticamente. Esta tendência na redução da viabilidade demonstra que de algum modo, a morte celular (por apoptose) tenderia a aumentar e a proliferação tenderia a

diminuir. Ou ainda, se há um aumento na proliferação, igualmente tem-se um aumento na viabilidade, teoricamente. Apesar de ser uma extrapolação ainda a ser confirmada por mais e outros experimentos, ou por maior tempo de exposição ao CME, o autor considera uma linha de raciocínio lógica. Este aumento na morte celular por apoptose poderia corroborar vários trabalhos que têm relatado este mesmo efeito como os de Zhang et al., 2017, Bekhite, et. al. (2016); Wang et al. (2016), mas não corrobora os achados de Marędziak et al. (2017), Lew et. al. (2016) e Wang et al. (2012), possivelmente pelos mesmo motivos supracitados.

5.4. Análise proteômica

5.4.1. Campo magnético compensado

Ao todo, 41 proteínas foram satisfatoriamente identificadas. Na análise comparativa, serão descritas apenas as comparações relevantes frente aos resultados de proliferação e viabilidade. A tabela 9 mostra as proteínas identificadas exclusivamente em um dos grupos. Para os grupos controle 24 h, controle 96 h, tratado 24 h e tratado 96 h foram identificadas 11, 4, 3 e 12 proteínas únicas, respectivamente.

Dentre as proteínas unicamente identificadas no grupo controle 24 h estão *Carbonic anhydrase 1*, *Endothelial transcription factor GATA-2*, *F-box/LRR-repeat protein 12* e várias isoformas de histonas H2B. A *Endothelial transcription factor GATA-2* é um fator de transcrição que regula a expressão do gene endothelin-1 em células endoteliais. A *F-box/LRR-repeat protein 12* está relacionada com a paralisação do ciclo celular em G1 (UNIPROT) e sua identificação neste grupo está relacionada com a proliferação, assim como a identificação de várias isoformas de histonas H2B, as quais são componentes centrais dos nucleossomas e regulam a duplicação do DNA por interferirem diretamente na acessibilidade a ele. Esta acessibilidade é regulada por uma complexa interação de modificações pós-traducionais das histonas, também chamado de código das histonas, bem como remodelação dos nucleossomas (UNIPROT).

No grupo controle 96 h foram identificadas exclusivamente isoformas de histonas H2A, que também fazem parte dos nucleossomas como as histonas H2B, mas também estão envolvidas na formação da heterocromatina constitutiva e podem ser necessárias para a segregação dos cromossomas durante a divisão celular, assim como para o desenvolvimento inicial (UNIPROT). Também foi identificada com exclusividade a *Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1*, enzima relacionada com a maturação do heparan sulfato, essencial para

que o mesmo participe em várias interações de alta afinidade com ligantes específicos e processos de sinalização (UNIPROT). Duas ou três cadeias de heparan sulfato estão ligadas em íntima proximidade com a superfície celular ou as proteínas da matriz extracelular, constituindo proteoglicanas, e isto permite que interajam com vários ligantes proteicos, regulando várias atividades biológicas, como processos de desenvolvimento, angiogênese, coagulação sanguínea e metástase tumoral (LANZI et al., 2017). Outra proteína identificada com exclusividade neste grupo foi a *Kin of IRRE-like protein 3*, envolvida com a capacidade de suporte hematopoiético de células do estroma. O domínio extracelular secretado é diretamente responsável pela capacidade de suporte de células-tronco hematopoiéticas (UNIPROT).

No grupo tratado 24 h foram identificadas exclusivamente a proteína Ermin, que desempenha um papel no rearranjo do citoesqueleto durante as fases tardias de empacotamento e/ou compactação da mielinogênese, bem como na manutenção da estabilidade da bainha de mielina no adulto. Pode ter um importante papel na maturação da oligodendroglia em estágio tardio, formação dos nós de mielina/Ranvier durante o desenvolvimento do SNC e na manutenção e plasticidade de estruturas relacionadas no SNC maduro (UNIPROT). Dentre os efeitos celulares produzidos por campos magnéticos de intensidade moderada têm sido reportadas alterações no citoesqueleto, especialmente envolvendo reorganização e quebra de filamentos de F-actina e microtúbulos, bem como alteração na morfologia da membrana plasmática (LISI et al., 2008; DINI; ABBRO, 2005; ROSEN, 2003). Em adição, tem sido relatado que o mecanismo de reorganização e quebra de diferentes elementos do citoesqueleto está relacionado à modificação na homeostasia do Ca^{+2} intracelular (DINI; ABBRO, 2005; ROSEN, 2003), sendo que proteínas ligadoras de Ca^{+2} também foram identificadas com expressão alterada em nosso estudo. No presente estudo, no grupo tratado com CMC por 24 h, a identificação exclusiva da Ermin, uma proteína relacionada ao rearranjo do citoesqueleto, vai ao encontro destes relatos e pode ajudar a explicar o aumento na viabilidade celular observado para este grupo já em 24 h de tratamento, enquanto que para o grupo controle, o aumento da viabilidade celular em relação ao baseline só ocorreu a partir de 48 h de tratamento. Também foi identificada a Probable isocitrate dehydrogenase [NAD] gamma 2, mitochondrial, uma enzima que catalisa a descarboxilação do isocitrato, produzindo alfa-cetoglutarato e CO_2 (UNIPROT). Identificou-se ainda a Transmembrane gamma-carboxyglutamic acid protein 2 relacionada à ligação iônica do Cálcio (Ca^{2+}) e à atividade endopeptidase tipo-serina, cuja função molecular é catalisar a hidrólise de ligações alfa-peptídicas internas em uma cadeia polipeptídica por um mecanismo

catalítico que envolve uma tríade catalítica consistindo de uma serina nucleófila que é ativada por uma retransmissão de próton envolvendo um resíduo ácido (por exemplo, aspartato ou glutamato) e um resíduo básico, comumente a histidina (UNIPROT; GO). Alterações em níveis de Ca^{2+} têm sido comumente relatadas dentre os efeitos produzidos por campos magnéticos de baixa e moderada intensidade. Estas alterações em níveis de canais de Ca^{2+} envolvem alterações dos fluxos extra e intracelulares, transporte através da membrana e sinalização por Ca^{2+} (GAETANI et al., 2009; DINI; ABBRO, 2005; VOROBYOV et al., 1998; BLACKMAN et al., 1985). No presente estudo, observou-se um aumento significativo na viabilidade celular no grupo tratado com o CMC por 24 h em relação ao baseline, o que poderia estar relacionado de alguma maneira a estas alterações nos níveis intracelulares de Ca^{2+} (Figura 15).

Figura 15 – Ação do CMC em 24h. A- Célula MSC/AJ normal do grupo controle. B- Célula MSC/AJ tratada com CMC por 24h, com morfologia da membrana plasmática alterada com alteração da homeostase da concentração interna de Cálcio.

Fonte: Desidério (2017).

Já no grupo tratado 96h foram encontradas algumas subunidades de hemoglobina, relacionada ao transporte de oxigênio dos pulmões para vários tecidos periféricos e uma subunidade de hemoglobina *epsilon-Y2* que é uma cadeia de tipo beta encontrada em embriões (UNIPROT). Também foi encontrada Interleucina-31 relacionada com processos do sistema imunológico e Interleucina-20, relacionada a outros processos biológicos tais como hematopoiese, respostas imune e inflamatória, bem como diferenciação de osteoclastos, entre outras (UNIPROT). Individualmente foram identificadas: a *Brain-enriched guanylate kinase-associated protein* relacionada possivelmente ao suporte da estrutura de densidade pós-

sináptica e está localizada no citoplasma e na membrana como uma proteína de membrana periférica. A *Desumoylating isopeptidase 2*, uma protease que pode desconjugar a SUMO de outras proteínas substratos, também encontrada no citoplasma. A *Epididymal-specific lipocalin-12* que se liga ao ácido retinóico *all-trans* e pode agir como uma proteína carreadora retinoide dentro do epidídimo (UNIPROT), com papel na fertilidade do macho. Foi encontrada também a *Forkhead box protein P2 – Foxp2*, um repressor de transcrição que pode ter um papel na especificação e diferenciação do epitélio do pulmão. Também pode desenvolver os tecidos neural, gastrointestinal e cardiovascular. Pode agir com CRBP1 para reprimir sinergisticamente a transcrição, mas o CTBP1 não é essencial. Pela regulação dos níveis de SRPX2, também age na formação da sinapse. Como esta proteína é um inibidor da transcrição, a sua identificação exclusivamente no grupo tratado com CMC por 96 h poderia ajudar a explicar a diminuição da proliferação celular observada para este grupo, em relação ao controle, embora a diferença observada não tenha sido significativa (Figura 16).

Figura 16 – Ação do CMC em 96h. A- Célula MSC/AJ normal do grupo controle. B- Célula MSC/AJ tratada com CMC por 96h, com morfologia da membrana plasmática alterada e com a proteína Foxp2 inibindo a transcrição.

Fonte: Desidério (2017).

A proteína *Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-10* foi identificada e estes tipos de proteínas (G) estão envolvidas como um modulador ou transdutor em vários sistemas de sinalização transmembrana. As cadeias beta e gamma são requeridas para a atividade GTPase, pela substituição do GDP pelo GTP, e pela interação proteína G-efetora. Interage com a beta-1 e beta-2, mas não com beta-3 (UNIPROT). Foi identificada

também a *euritin-like protein* localizada na membrana celular, mas que pode ter um componente ancorado na membrana plasmática, relacionando-se ao axônio ou ao espaço extracelular, agindo como extensão da projeção do neurônio com função molecular de heterodimerização proteica. Igualmente foi encontrada a *Pyruvate kinase PKM*, uma enzima glicolítica que cataliza a transferência de um grupo fosforil do fosfoenolpiruvato (PEP) para ADP, gerando ATP. Estimula a ativação transcricional mediada pelo POU5F1 (UNIPROT).

Tabela 9. Proteínas identificadas exclusivamente em um dos grupos após tratamento de células mesenquimais (MSC-A/J) tratadas com campo magnético compensado ou não (controle) por 24 ou 96 h.

Controle 24 h		
Número Acesso	Nome da proteína	Score PLGS
P13634	Carbonic anhydrase 1	118,74
O09100	Endothelial transcription factor GATA-2	132,29
Q9EPX5	F-box/LRR-repeat protein 12	93,28
Q64475	Histone H2B type 1-B	108,78
Q6ZWY9	Histone H2B type 1-C/E/G	108,78
P10853	Histone H2B type 1-F/J/L	108,78
Q64478	Histone H2B type 1-H	108,78
Q8CGP1	Histone H2B type 1-K	108,78
P10854	Histone H2B type 1-M	108,78
Q8CGP2	Histone H2B type 1-P	108,78
Q64525	Histone H2B type 2-B	108,78
Controle 96 h		
Q8R3H7	Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1	105,19
Q3THW5	Histone H2A.V	198,43
P0C0S6	Histone H2A.Z	198,43
Q8BR86	Kin of IRRE-like protein 3	77,37
Tratado 24 h		
Q5EBJ4	Ermin	63,23
Q8BPC6	Probable isocitrate dehydrogenase [NAD] gamma 2, mitochondrial	100,43
Q8R182	Transmembrane gamma-carboxyglutamic acid protein 2	109,81
Tratado 96 h		
Q68EF6	Brain-enriched guanylate kinase-associated protein	121,99
Q9D291	Desumoylating isopeptidase 2	271,25
Q6JVL5	Epididymal-specific lipocalin-12	154,88
P58463	Forkhead box protein P2	69,61
Q9CXP8	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-10	400,60
P02088	Hemoglobin subunit beta-1	535,37
P02089	Hemoglobin subunit beta-2	535,37
P02104	Hemoglobin subunit epsilon-Y2	535,37
Q9JKV9	Interleukin-20	212,68
Q6EAL8	Interleukin-31	143,30
Q8C4W3	Neuritin-like protein	108,79
P52480	Pyruvate kinase PKM	363,35

Fonte: Desidério (2017).

Na análise da diferença de expressão, foram consideradas as seguintes comparações relevantes: controle 96h vs controle 24h (não houve proteínas com alteração significativa na expressão), tratado 96h vs tratado 24h, tratado 24h vs controle 24h e tratado 96h vs controle 24h (não houve proteínas com alteração significativa na expressão) (Tabela 10).

Foram encontradas 5 proteínas sub-reguladas no grupo tratado por 96h em relação ao grupo tratado por 24h, a saber: *Beta-actin-like protein 2*, *Actin cytoplasmic 1 e 2*, *Vimentin* e *Macrophage migration inhibitory fator*. As actinas são proteínas altamente conservadas que estão envolvidas em vários tipos de motilidade celular e são expressas ubiquamente em todas as células eucarióticas. As vimentinas são filamentos intermediários classe-III encontrados em várias células não-epiteliais, especialmente células mesenquimais. A Vimentina está ligada ao núcleo, retículo endoplasmático e mitocôndria, tanto lateralmente como terminalmente (UNIPROT). A diminuição na expressão destas proteínas relacionadas ao citoesqueleto no grupo tratado por 96 h com o CMC em relação ao grupo tratado por 24 h pode indicar uma menor motilidade celular, com impacto na velocidade de proliferação, que foi diminuída (embora sem significância estatística) no grupo tratado com o CMC por 96 h em relação ao grupo controle de 96 h (Figura 17).

Figura 17 – Comparação dos efeitos do CMC nos Grupos Tratado 96h X Tratado 24h. A- Célula MSC/AJ tratada com CMC por 24h. B- Célula MSC/AJ tratada com CMC por 96h, com morfologia da membrana plasmática alterada e sub-regulação das proteínas de motilidade.

Fonte: Desidério (2017).

Outra proteína com alteração de expressão identificada nesta comparação foi a *Macrophage migration inhibitory fator*, uma citocina pro-inflamatória envolvida na resposta imune inata a patógenos bactericos. A expressão do fator inibitório em locais de inflamação

sugere um papel como mediador na regulação da função de macrófagos na defesa do hospedeiro. Contrapõe com a atividade anti-inflamatória de glicocorticóides. Tem atividade (*in vitro*) do fenilpiruvato tautomerase e dopacromo tautomerase, mas o substrato não é conhecido. Não está claro se a atividade tautomerase possui alguma relevância fisiológica, e se é importante para atividade da citocina. Aparentemente esta proteína não tem relação com as alterações na proliferação e viabilidade celulares, induzidas pelo CMC no presente estudo.

Já no grupo tratado por 24h em relação ao controle de 24h, três proteínas super-reguladas foram encontradas, sendo todas elas actinas (*Actin, cytoplasmic 1 e 2 e Beta-actin-like protein 2*). Estas proteínas aumentadas no grupo tratados com o CMC por 24 h em relação ao controle no mesmo período podem estar relacionadas à maior viabilidade apresentada pelas células do grupo tratado em relação ao período *baseline* (Figura 18). Cabe ressaltar que a diferença na viabilidade entre o grupo tratado e o grupo controle no período de 24 h não foi significativa, mas as células do grupo tratado tiveram um aumento significativo na viabilidade já após 24 h de tratamento com o CMC, enquanto que para o grupo controle, o aumento na viabilidade em relação ao *baseline* só ocorreu a partir de 48 h de tratamento.

Figura 18 – Comparação dos efeitos do CMC nos Grupos Controle 24h X Tratado 24h. A- Célula MSC/AJ normal do grupo controle. B- Célula MSC/AJ tratada com CMC por 24h, com morfologia da membrana plasmática alterada e super-regulação das proteínas de motilidade.

Fonte: Desidério (2017).

Em conclusão, a exposição ao CMC tendeu a reduzir a proliferação das células de medula óssea MSC/AJ em relação ao controle em 96 h, porém sem diferença significativa, o que poderia estar relacionado a proteínas que inibem a transcrição, como a *Forkhead box*

protein P2. Este mesmo campo aumentou a viabilidade celular em relação ao baseline para todos os tempos experimentais, o que poderia estar relacionado a proteínas relacionadas à ligação ao Ca^{+2} . Esses mecanismos, entretanto, precisam ser estudados mais profundamente para que possam ser comprovados ou não. Já a exposição ao CME levou a uma tendência à diminuição da proliferação e viabilidade celular em relação ao grupo controle, embora sem diferenças significativas, provavelmente por conta do tamanho amostral e tempo de avaliação (24 h).

Tabela 10. Quantificação relativa das proteínas com diferença de expressão significativa após tratamento de células mesenquimais (MSC-A/J) tratadas com campo magnético compensado ou não (controle) por 24 ou 96 h.

Número de acesso	Nome da proteína	Ratio	p
Tratado 96h:Tratado 24h			
Q8BFZ3	Beta-actin-like protein 2	0,76	0,04
P34884	Macrophage migration inhibitory factor	0,57	0,02
P20152	Vimentin	0,32	0
P63260	Actin, cytoplasmic 2	0,66	0
P60710	Actin, cytoplasmic 1	0,68	0
Tratado 24h:Controle 24 h			
P60710	Actin, cytoplasmic 1	1,39	0,97
P63260	Actin, cytoplasmic 2	1,36	0,96
Q8BFZ3	Beta-actin-like protein 2	1,30	0,96

Fonte: Desidério (2017).

É interessante ressaltar que alguns dos efeitos biológicos celulares da exposição à CMs em geral, sejam de qualquer tipo, podem ser considerados comuns independentes da intensidade. Isto sugere que alguns efeitos comecem a surgir em baixas intensidades e continuem a se manifestar em intensidades magnéticas mais altas, bem como novos efeitos possam começar a surgir em intensidades moderadas e permanecer nas mais altas e assim sucessivamente. Esta proposição pode ser verificada a partir da análise proteômica realizada com o primeiro *design* experimental com CMC (baixíssima intensidade, tendendo a zero). Algumas proteínas encontradas confirmam estes efeitos que foram descritos na literatura citada tanto em baixas como em moderadas e altas intensidades. Dini; Abbro (2005), explicam que efeitos biológicos de CMEs [fracos e] moderados são sub-letais, porém podem ser cumulativos com o aumento do tempo de exposição, e podem agir como cofatores para o desenvolvimento de doenças, incluindo tumores. Não obstante, estes autores citam trabalhos indicando o potencial terapêutico de Campos Eletromagnéticos ou Magnéticos, em algumas áreas específicas.

6 CONCLUSÕES

6. Conclusões

No presente trabalho, foi possível construir com sucesso um dispositivo que produzisse dois tipos de campos magnéticos, a depender da disposição dos ímãs (CME e CMC). Este dispositivo poderá ser empregado em futuros estudos que visem a avaliar o efeito de campos magnéticos de intensidade fraca ou moderada sobre culturas celulares de diferentes tipos.

As culturas de células mesenquimais MSC/AJ foram expostas aos dois tipos de campos, e foram avaliados seus efeitos na proliferação e viabilidade celulares.

A exposição ao CMC tendeu a reduzir a proliferação celular em relação ao controle em 96 h, porém sem diferença significativa, o que poderia estar relacionado a proteínas que inibem a transcrição, como a *Forkhead box protein P2 (FoxP2)*. Este mesmo campo aumentou a viabilidade celular em relação ao *baseline* para todos os tempos experimentais, o que poderia estar relacionado a proteínas relacionadas à ligação ao Ca^{+2} . Esses mecanismos, entretanto, precisam ser estudados mais profundamente para que possam ser comprovados ou não. Já a exposição ao CME levou a uma tendência à diminuição da proliferação e viabilidade celulares em relação ao grupo controle, embora sem diferenças significativas, provavelmente por conta do tamanho amostral e tempo de avaliação (24 h).

REFERÊNCIAS

Referências

- ALDINUCCI C.; et al. The effect of exposure to high flux density static and pulsed magnetic fields on lymphocyte function. **Bioelectromagnetics**, n. 24, p. 373–379, 2003.
- AMIN, H. D.; et al. Stimulation of chondrogenic differentiation of adult human bone marrow-derived stromal cells by a moderate-strength static magnetic field. **Tissue Eng Part A**, v. 20, n. 11-12, p. 1612-1620, jun. 2014.
- ANDRADE, H. G.; **A Teoria Corpuscular do Espírito**. Uma extensão dos conceitos quânticos e atômicos à ideia do espírito. Votuporanga: Didier, reed. 2007 (original de 1958).
- ARRUDA, A. C. F.; CARDOSO, G. B. C. O papel das células tronco na engenharia tecidual. **Ciências & Cognição**, v. 14, n. 3, p. 214-219, 2009.
- ARTHUR, J. M. et al. Differential expression of proteins in renal cortex and medulla: a proteomic approach. **Kidney Int.**, v. 62, n. 4, p. 1314-1321, 2002.
- BARNOTHY, M. F. **Biological effects of magnetic fields**. New York: Plenum Press, 1964.
- BEETESON, J. Vizimag, 3.18. [S.l.], 2009, online. Disponível em: <<http://downloads.fyxm.net/Vizimag-111724.html>>. Acesso em: 01 jul. 2013.
- BEISCHER, D. R.; KNEPTON, J. C. The electroencephalogram of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) in a very high magnetic field. **NAMI Rep**, v. 972, 1966.
- BEKHITE, M. M. et al. Differential effects of high and low strength magnetic fields on mouse embryonic development and vasculogenesis of embryonic stem cells. **Reprod Toxicol**, v. 65, p. 46-58, 2016.
- BELIAEV, I. Y.; ALIPOV, Y. D., HARMS-RINGDAHL, M. The effect of weak static and alternating magnetic fields on the genome conformational state of *E. Coli* cells: the evidence for model of phase modulation of high frequency oscillations. In: ALLEN, M. J. (Ed.). **Charge and Field Effects in Biosystems**. Singapura: 4 World Scientific Publishing Co. PTE Ltd, 1994, p. 174-184.
-
-

BELYAEV, I. Y.; MATRONCHIK, A. Y.; ALIPOV, Y. D. Effects of zero magnetic field on the conformation of chromatin in human cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1336, n. 3, p. 465-73, out. 1997.

BINHI, V. N.; ALIPOV, Y. D.; BELYAEV, I. Y. Effect of static magnetic field on *E. coli* cells and individual rotations of ion-protein complexes. **Bioelectromagnetics**, v. 22, n. 2, p. 79-86, fev. 2001.

BLACKMAN, C. F.; BENANE, S. G.; RABINOWITZ, J. R.; HOUSE, D. E.; JOINES, W. T. A role for the magnetic field in the radiation-induced efflux of calcium ions from brain tissue in vitro. **Bioelectromagnetics**, v. 6, p. 327–337, 1985.

BONJORNO, R. A. et al. **Física Fundamental: 2º Grau: Volume único**. São Paulo: FTD, 1993.

BRANCO, P. M. Magnetismo Terrestre, **CPRM – Serviço geológico do Brasil**, 2015. Disponível em: <<http://www.cprm.gov.br/publique/Redes-Institucionais/Rede-de-Bibliotecas---Rede-Ametista/Canal-Escola/Magnetismo-Terrestre-2623.html>>. Acesso em: 05 nov. 2016.

CHEN, G.; XU, Z. Global Protein Expression in Response to Extremely Low Frequency Magnetic Fields. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 990, p. 107-110, jan. 2013.

D'AMBROSIO, U. **Transdisciplinaridade**. São Paulo: Palas Athena, 2001.

DINI, L.; ABBRO, L. Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. **Micron**, v. 36, n. 3, p. 195–217, abr. 2005.

FANELLI C.; et al. Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca²⁺ influx. **FASEB Journal**, v. 13, p. 95– 102, 1999.

FEDROWITZ, M. et al., Magnetic field exposure increases cell proliferation but does not affect melatonin levels in the mammary gland of female *Sprague Dawley* rats. **Cancer Res**, v. 62, n. 5, p. 1356-1363, 2002.

FEYCHTING, M., AHLBOM, A., KHEIFETS, L. EMF and health. **Ann. Rev. Pub. Health.**, v. 26, p. 165–189, 2005.

FRANÇA, A. M. et al. **INMETRO - Serviços e segurança na metrologia de alta tensão e alta corrente**. 2005. Disponível em: <<https://www.yumpu.com/pt/document/view/9338434/servicos-e-seguranca-na-metrologia-de-alta-tensao-e-alta-inmetro>>. Acesso em: 09 out. 2013.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells**: a manual of basic technique and specialized applications. New Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2010, 6th ed.

GAETANI, R. et al. Differentiation of human adult cardiac stem cells exposed to extremely low-frequency electromagnetic field. **Cardiovasc Res**, v. 82, p. 411–420, 2009.

GO. **Gene Ontology**. Disponível em:
<<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GProtein?ac=Q8R182>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

HABERMANN, M. et al. Desigualdade social e exposição a campos magnéticos na Região Metropolitana de São Paulo. **Rev Saúde Pública**, v. 44, n.4, p. 703-709, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102010000400014>. Acesso em: 10 out 2013.

HEWITT, P. G. **Física conceitual**. 9. Ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.

HUANG, L. et al. Effects of sinusoidal magnetic field observed on cell proliferation, ion concentration, and osmolarity in two human cancer cell lines. **Electromagn Biol Med**, v. 25, n. 2, p. 113-126, 2006.

HONG, C. et al. Learning ability of young rats is unaffected by repeated exposure to a static electromagnetic field in early life. **Bioelectromagnetics**, v. 9, p. 269–273, 1988.

IRPA/INIRC. Interim guidelines on limits of exposure to 50/60 Hz electric and magnetic fields. **Health Phys.**, v. 58, p. 113–122, 1990.

INIRC. Guidelines on limits of exposure to static magnetic fields. **Health Phys**, v. 66, p. 100–106, 1994.

JANSEN, J. H. et al. Stimulation of osteogenic differentiation in human osteoprogenitor cells by pulsed electromagnetic fields: an *in vitro* study. **BMC Musculoskelet Disord.**, v. 11, p. 188, 2010.

JOUNI, F. J. et al. Investigation on the effect of static magnetic field up to 15 mT on the viability and proliferation rate of rat bone marrow stem cells. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 49, n. 3, p. 212-219, 2013.

KAVALIERS, M., OSSENKOPP, K.P. Effects of magnetic and electric fields in invertebrates and lower vertebrates. In: CARPENTER, D.O. (Ed.). **Biological Effects**

of Electric and Magnetic Fields: Sources and Mechanisms. New York: Academic-Press, 1994, p. 205–240, v. 1.

KAIVOSOJA, E. et al. The effect of pulsed electromagnetic fields and dehydroepiandrosterone on viability and osteo-induction of human mesenchymal stem cells. **J Tissue Eng Regen Med.**, v. 9, p. 31–40, 2015.

KLIMOVSKAYA, L. D.; SMIRNOVA, N. P. Changes in brain evoked potentials under the influence of a permanent magnet field. **Bull. Exp. Biol. Med**, v. 82, p. 1125–1129, 1976.

KREBSBACH, P.H.; et al. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. **Crit. Rev. Oral Biol. Med**, v. 10, n. 2, p. 165-181, 1999.

KHOLODOV, Y. A. Influence of magnetic fields on biological objects. **Natl.Tech. Info. Serv.**, Springfield, v. 8, 1974.

LANCE, Laboratório Nacional de Células-tronco Embrionárias - RJ. **Células-tronco, o que são?**, 2013. Disponível em: <<http://www.lance-ufrrj.org/ceacutelulas-tronco.html>>. Acesso em: 02 out. 2013.

LANZI, C.; ZAFFARONI, N.; CASSINELLI, G. Targeting heparan sulfate proteoglycans and their modifying enzymes to enhance anticancer chemotherapy efficacy and overcome drug resistance. **Curr Med Chem**, v. 24, n. 42, 2017.

LEW, W.Z. Static Magnetic Fields Enhance Dental Pulp Stem Cell Proliferation by Activating The p38 MAPK Pathway as Its Putative Mechanism. **J Tissue Eng Regen Med**, 2016.

LIN, S.L. et al. Static magnetic field increases survival rate of dental pulp stem cells during DMSO-free cryopreservation. **Electromagn Biol Med**, v. 34, n. 4, p. 302-308, 2015.

LISI, A. et al. Ion cyclotron resonance as a tool in regenerative medicine. **Electromagn Biol Med.**, v. 27, p. 127–33, 2008.

LOPES, G. N. Compensador Espacial Eletromagnético. **Agro@ambiente On-line**, v. 1, n.1, jul/dez, 2007. Disponível em: <<http://revista.ufrr.br/index.php/agroambiente/article/view/143/79>>. Acesso em: 06 mar. 2013.

MAREȔDZIAK, 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.

MAZIARZ A. et al. How electromagnetic fields can influence adult stem cells: positive and negative impacts. **Stem Cell Res Ther**, v. 7, n. 1, p. 54, abr. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4834823/>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

MONTEIRO, B. S.; ARGOLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. Células-tronco mesenquimais. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, fev. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782010000100040&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 02 out. 2013.

MIURA, M. A crucial role of caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells. **J Clin Invest**, v. 114, n. 12, p. 1704-1713, 2004.

MORIN, E. **Ciência com consciência**. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2003.

MURAKAMI, J., TORII, Y., MASUDA, K. Fetal development of mice following intrauterine exposure to static magnetic field of 6.3 T. **Magn Reson Imaging**, v. 10, p. 433-437, 1992.

NAKAGAWA, M.; MATSUDA, Y. A strong static magnetic field alters operant responding in rats. **Bioelectromagnetics**, v. 9, p. 25-37, 1988.

NAKASONO S. et al. Effect of power-frequency magnetic fields on genome-scale gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Radiat Res**, v. 160, n. 1, p. 25-37, jul. 2003.

NICOLESCU, B. **O manifesto da Transdisciplinaridade**. São Paulo: Triom, 2008.

REITER, R. J. A review of neuroendocrine and neurochemical changes associated with static and extremely low frequency electromagnetic field exposure. **Integrated Physiology Behavioural Science**, v. 28, p. 57-75, 1993.

REPACHOLI, M. H.; GREENEBAUM, B. Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems: health effects and research needs. **Bioelectromagnetics**, v. 20, p. 133-160, 1999.

ROSEN A. D. Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1282 p. 149–155, 2003.

ROSEN, A. D.; LUBOWSKY, J. Magnetic field influence on central nervous system function. **Exp. Neurol.**; v. 95, p. 679–687, 1987.

SAITO, K.; SUZUKI, H.; SUZUKI, K. Teratogenic effects of static magnetic field on mouse fetuses. **Reprod Toxicol.**, v. 22, p. 118-124, 2006.

SINCLAIR J. et al. Proteomic response of *Schizosaccharomyces pombe* to static and oscillating extremely low-frequency electromagnetic fields. **Proteomics**, v. 6, n. 17, p. 4755–4764, set. 2006.

TACH, J. S. A behavioral effect of intense dc electromagnetic fields. In: VAGTBORG, H. **Use of nonhuman primates in drug evaluation**. Austin: Univ. of Texas Press, 1968. p. 347–356.

TEODORI L.; et al. Static magnetic fields affect calcium fluxes and inhibit stress-induced apoptosis in human glioblastoma cells. **Cytometry**, n. 49, p. 143–149, 2002a.

TEODORI, L.; et al. Exposure of cells to static magnetic fields accelerates loss of integrity of plasma membrane during apoptosis. **Cytometry**, n. 49, p. 113–118, 2002b.

THOMAS, J. R.; SCHROT, J.; LIBOFF, A.R. Low-intensity magnetic fields alter operant behavior in rats. **Bioelectromagnetics**, v. 7, p. 349–357, 1986.

THONGBOONKERD, V.; KLEIN, E.; KLEIN, J. B. Sample preparation for 2-D proteomic analysis. **Contrib Nephrol**, v. 141, p. 11-24, 2004.

THUN-BATTERSBY, S. et al. Exposure of *Sprague-Dawley* rats to a 50-Hertz, 100-microTesla magnetic field for 27 weeks facilitates mammary tumorigenesis in the 7,12-dimethylbenz[a]-anthracene model of breast cancer. **Cancer Res**, v. 59, n. 15, p. 3627-3633, 1999.

TRILLO, M. A. et al. Influence of a 50 Hz magnetic field and of all-trans-retinol on the proliferation of human cancer cell lines. **Int J. Oncol**, n. 40, p.1405-1413, 2012.

TSAI, M. T. et al. Modulation of osteogenesis in human mesenchymal stem cells by specific pulsed electromagnetic field stimulation. **J Orthopaed Res.**, v. 27, p. 1169–1174, 2009.

UNIPROT. **Universal Protein Resource**. Disponível em:
<<http://www.uniprot.org/uniprot/>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

VOROBYOV, V. V.; SOSUNOV, E. A.; KUKUSHKIN, N. I.; LEDNEV, V. V. Weak combined magnetic field affects basic and morphine-induced rat's EEG. **Brain Research**, v. 781, p. 182–187, 1998.

WALTHER, M. et al. Effects of weak, low-frequency pulsed electromagnetic fields (BEMER type) on gene expression of human mesenchymal stem cells and chondrocytes: an *in vitro* study. **Electromagn Biol Med.**, v. 26, p. 179–190, 2007.

WANG, J. et al. 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 International**, p. 1-12, Jan. 2016. Disponível em:
<<https://www.hindawi.com/journals/sci/2016/7168175/>>. Acesso em: 01 out. 2016.

WANG, J. Q.; et al. [Effects of static magnetic field at different times on the proliferation and differentiation of osteoblasts in vitro]. **Zhongguo Gu Shang**, v. 25, n. 11, p. 931-936, nov. 2012.

WEIL, P.; D'AMBROSIO, U.; CREMA, R. **Rumo à nova transdisciplinaridade: sistemas abertos de conhecimento**. São Paulo: Summus, 1993.

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