

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE FÍSICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTIDISCIPLINAR EM FÍSICA APLICADA

**O EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS ESTÁTICOS SOBRE
FIBROBLASTOS EM CULTURA**

ÍISIS PAES D' ASSUMPÇÃO PEREZ

RIO DE JANEIRO

2022



ÍISIS PAES D' ASSUMPÇÃO PEREZ

**O EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS ESTÁTICOS SOBRE
FIBROBLASTOS EM CULTURA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação Multidisciplinar em Física Aplicada, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Física Aplicada.

Área de concentração: Física Médica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Bruno de Almeida Carlos de Carvalho Pontes

Coorientador: Prof. Dr. Nathan Bessa Viana

RIO DE JANEIRO

2022

ÍSYS PAES D' ASSUMPÇÃO PEREZ

**O EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS ESTÁTICOS SOBRE
FIBROBLASTOS EM CULTURA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação Multidisciplinar em Física Aplicada, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Física Aplicada.

Área de concentração: Física Médica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Bruno de Almeida Carlos de Carvalho Pontes

Coorientador: Prof. Dr. Nathan Bessa Viana

Aprovado em: 10 de Fevereiro de 2022.

Ata nº4 de Defesa de Dissertação de Mestrado para concessão do Grau de Mestre em Física Aplicada pelo Programa de Pós-graduação Multidisciplinar em Física Aplicada do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio de Janeiro – IF-UFRJ. Ao décimo dia do mês de fevereiro de dois mil e vinte e dois, remotamente por plataforma digital, conforme permitido pela Resolução CEPG 03/2020, perante os membros da Banca Examinadora, para a obtenção do Grau de Mestre em Física Aplicada, compareceu a aluna Ísis Paes d'Assumpção Perez para a defesa de sua dissertação intitulada “O EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS ESTÁTICOS SOBRE

FIBROBLASTOS EM CULTURA”, realizada sob a orientação dos professores Bruno de Almeida Carlos de Carvalho Pontes (Orientador) e Nathan Bessa Viana (Coorientador). A Banca Examinadora presente compunha-se dos seguintes professores: Bruno de Almeida Carlos de Carvalho Pontes (ICB-UFRJ, Presidente, Orientador), Nathan Bessa Viana (IF-UFRJ, Coorientador), Marcelo Salabert Gonzalez (GBG-UFF) e Sara Gemini Piperni (ICB-UFRJ). O presidente da Banca Examinadora deu início aos trabalhos às quatorze horas, dando a palavra à candidata, tendo a mesma até cinquenta minutos para a exposição da dissertação. Após a exposição a candidata foi arguida pela Banca Examinadora. Terminada a arguição a Banca reuniu-se e, após o julgamento, a candidata foi APROVADA. Para constar, eu, Bruno de Almeida Carlos de Carvalho Pontes, lavrei a presente ata que vai assinada por mim. Rio de Janeiro, 10 de fevereiro de 2022, Professor permanente do Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar em Física Aplicada do Instituto de Física da UFRJ.

1 - Dr. Bruno de Almeida Carlos de Carvalho Pontes (Presidente)

2 - Dr. Nathan Bessa Viana (Membro interno)

3 - Dr. Marcelo Salabert Gonzalez (Membro interno)

4 - Dra. Sara Gemini Piperni (Membro externo)

5 - Ísis Paes D'Assumpção Perez (Candidata)

CIP - Catalogação na Publicação

PP438e Paes d' Assumpção Perez, Ísis
O Efeito da Exposição de Campos Magnéticos
Estáticos sobre Fibroblastos em Cultura / Ísis Paes
d' Assumpção Perez. -- Rio de Janeiro, 2022.
78 f.

Orientador: Bruno de Almeida Carlos de Carvalho
Pontes.
Coorientador: Nathan Bessa Viana.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Instituto de Física, Programa de Pós
Graduação Interdisciplinar em Física Aplicada, 2022.

1. efeito biológico de campos magnéticos. 2.
fibroblasto. 3. magnetobiologia. 4. campo magnético
estático. 5. bioeletromagnetismo. I. de Almeida
Carlos de Carvalho Pontes, Bruno, orient. II. Bessa
Viana, Nathan, coorient. III. Título.

Dedico este trabalho a todos os filósofos e cientistas, que contribuem para o desenvolvimento do saber na humanidade, aos profissionais de saúde e especialmente às corajosas mulheres e mães cientistas.

Dedico este trabalho também ao meu filho Dimitri, cuja gestação e nascimento ocorreu durante o decorrer do mestrado, e que me trouxe sempre inspiração e alegria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, às principais pessoas que tornaram esse trabalho possível: meus orientadores Nathan Viana e Bruno Pontes. Agradeço por todo apoio e amizade que tiveram durante a produção e desenvolvimento deste trabalho. Desde o início sempre me incentivaram, ainda nos momentos mais difíceis e desafiadores. Agradeço por terem sido sempre compreensivos, presentes, pacientes e solícitos. E agradeço por toda disponibilidade, atenção e por seus importantes ensinamentos.

Agradeço ao meu marido André Bassoli, que sempre me auxiliou, principalmente nos momentos difíceis. André sempre esteve presente para ouvir todas as minhas ideias, questionamentos, dúvidas, frustrações e reflexões acerca da pesquisa, dos experimentos e do trabalho desenvolvido.

Agradeço a todos meus familiares, principalmente a minha querida vó Ielva, que sempre cuidou de mim, me apoiou em meus sonhos e que esteve presente em toda minha vida, e que pude estar junto até seu último dia de vida, quando veio a falecer no dia 26 de dezembro de 2021, em casa, com toda sua família. À Vanessa, à Talita, à Iana, à Silvana, ao Juan, à Abigail, ao Santiago e à minha sogra Lilian. Agradeço ao meu avô Acaio que não está mais entre nós, mas me inspirou na busca pelo conhecimento e na integração dos saberes. E agradeço aos meus amigos que contribuíram de alguma forma, principalmente meus amigos de infância Flávio, Priscila, Daniel e Ana Paula. Agradeço ao meu amigo Lucas, pelos diálogos esclarecedores.

Agradeço aos meus professores de todas as disciplinas, aos professores que me inspiraram no caminho do saber, e à coordenação do Programa de Pós-graduação Multidisciplinar em Física Aplicada. Também à Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Agradeço ao professor Jean Houzel por ter me apresentado esse mestrado, me incentivando a desenvolver a pesquisa acadêmica. Agradeço ao Fernando e Beatriz, que, vários anos antes, me ensinaram muito sobre cultura de células e laboratório durante minha experiência em Biomanguinhos, quando ainda estava fazendo estágio durante a faculdade.

Durante o curso dessa pós-graduação passei pelas alegrias e desafios de uma gravidez e pelo nascimento de meu primeiro filho em maio de 2019 (que está prestes a completar 3 anos).

Também passei pelo diagnóstico de um câncer de tireoide dois meses após o nascimento de meu filho, e pela cura dessa doença através de uma cirurgia de tireoidectomia total. Após minha recuperação, passei por um quadro autoimune de difícil diagnóstico, de neurite óptica, que atrapalhou minha acuidade visual durante alguns meses, condição a qual me recuperei praticamente completamente. Agradeço aos profissionais envolvidos na minha recuperação e cura.

Passamos também pela pandemia de Covid-19, situação que prejudicou a realização de atividades presenciais, essenciais para o desenvolvimento dos

experimentos propostos. Enfrentamos também esse desafio, realizando os experimentos com todas as medidas de segurança necessárias.

Graças ao trabalho de diversas pessoas e ao apoio de meus orientadores, familiares, amigos, professores e à virtude da resiliência, foi possível superar todos os desafios que apareceram, e realizar o trabalho proposto.

Por fim, agradeço ao apoio financeiro da CAPES, CNPq e FAPERJ.

“Examinando o conteúdo deste volume, sinto-me justificada em expressar minha esperança de que, no devido tempo, o campo magnético se transforme em uma nova ferramenta analítica e terapêutica poderosa da medicina”.

(Madeleine Forro Barnothy, Doutora em Física, no prefácio do seu livro “Biological Effects of Magnetic Fields” – Volume 1, 1964.)

RESUMO

PEREZ, Ísis Paes d' Assumpção. **O Efeito da Exposição de Campos Magnéticos Estáticos sobre Fibroblastos em Cultura. 77 páginas.** Rio de Janeiro, 2022. Dissertação (Mestrado Multidisciplinar em Física Aplicada) – Instituto de Física, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2022.

As aplicações biológicas de campos magnéticos aparecem desde os primeiros relatos da observação de Tales de Mileto sobre o magnetismo, no século VI a.C. Diversos estudos têm apontado para a presença de efeitos biológicos dos campos magnéticos sobre células vivas em cultura. Porém, os resultados encontrados são bastante conflitantes e algumas das principais causas parecem ser as diferenças nas direções, sentidos e magnitudes dos campos, além da variabilidade natural das células. Essa dissertação tem como objetivo geral revisitar os efeitos da exposição de campos magnéticos estáticos externos sobre células vivas em cultura. Como objetivos específicos, propomos verificar o efeito de campos magnéticos estáticos sobre células de fibroblastos NIH3T3. Buscamos reconhecer possíveis diferenças em crescimento e migração celular, caracterizando de maneira quantitativa correlações entre a exposição de campos magnéticos estáticos e o aumento de mitoses e mudanças nas velocidades de migração. Analisamos os efeitos dos campos magnéticos estáticos também em um modelo de “fechamento de ferida”. Para tanto, realizamos experimentos em estufa e em videomicroscopia para avaliar o efeito de campos magnéticos sobre estas células. Utilizamos as condições: controle; Porta Amostras \rightarrow , com campos magnéticos de polo norte e sul nas laterais da amostra, de magnitude de $(36,6 \pm 0,2)$ mT no centro da placa; e condições nas quais o ímã de neodímio foi colocado abaixo da placa nas direções Polo Norte \uparrow , de magnitude de (325 ± 3) mT; (4) Polo Sul \downarrow , de magnitude de (396 ± 4) mT; e Polo Norte_(maior) \uparrow de magnitude de (280 ± 1) mT. Os resultados obtidos nestes experimentos mostraram um aumento significativo de proliferação na condição Porta Amostras \rightarrow , de aproximadamente 53% ($r/r_c = 1.53 \pm 0.16$), após 24h de exposição. Nessa mesma condição observamos um aumento de 1.41 vezes na taxa de mitose de células. Entretanto, não obtivemos diferenças significativas nas outras condições experimentais usadas. Nos experimentos de migração celular e de “fechamento de ferida” realizados apenas na

condição Porta Amostras $\overrightarrow{}$, as células não apresentaram modificações de migração, direcionamento ou redução de área na presença de campo magnético. Concluímos que os campos magnéticos estáticos utilizados em nosso estudo são capazes de gerar efeitos somente sobre a proliferação de células de fibroblastos NIH3T3 em determinadas condições específicas. Nenhum efeito sobre migração celular foi observado.

Palavras-chave: fibroblasto; magnetobiologia; efeito biológico dos campos magnéticos; campo magnético estático; biomagnetismo; bioeletromagnetismo.

ABSTRACT

The biological applications of magnetic fields appear since the first reports of Thales of Miletus' observation of magnetism, in the 6th century B.C. Several studies have pointed to the presence of biological effects of magnetic fields on living cells in culture. However, the results are quite conflicting and one of the main causes seems to be the differences in the directions and magnitudes of the fields, in addition to the natural variability of cells. This dissertation aims to revisit the effects of external static magnetic fields on living cells in culture. We propose to verify the effect of static magnetic fields on NIH3T3 fibroblast cells and to recognize possible differences in cell growth and migration, quantitatively characterizing correlations between exposure to static magnetic fields and changes in mitosis and migration rates and in “wound closure” model. We used the conditions: control; Sample Holder, with north and south poles magnetic fields on the sides of the sample, of magnitude (36.6 ± 0.2) mT in the center of the plate; and conditions in which the neodymium magnet was placed below the plate in the North Pole directions, of magnitude (325 ± 3) mT; (4) South Pole, with a magnitude of (396 ± 4) mT; and North Pole of magnitude (280 ± 1) mT. Our results showed a significant increase in the proliferation rate in the Sample Holder condition, approximately 53% ($r/rc = 1.53 \pm 0.16$) after 24h of exposure, and a 1.41-fold increase in cell mitosis rate. However, we did not observe significant differences in the other experimental conditions used. Cell migration and “wound closure” analysis, performed only in the Sample Holder condition, also did not show significant differences in the presence of magnetic field, when compared to control. We conclude that static magnetic fields used in our study are capable of generating effects only in the proliferation of NIH3T3 fibroblasts under certain specific conditions. No effect on cell migration was observed.

Keywords: fibroblast; magnetobiology; biological effect of magnetic fields; static magnetic field; biomagnetism; bioelectromagnetism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ímãs de ferrite e neodímio que geralmente são utilizados em tratamento de magnetoterapia associado à acupuntura.....	31
Figura 2 – Fotos dos dias 1, 3 e 7 de evolução de hematoma, após aplicação de magnetoterapia com ímãs de ferrite de 600 gauss (60 mT). Paciente mulher, 54 anos, apresentou hematoma de cerca de 20x14 cm, após lesão por queda, na coxa direita.....	32
Figura 3 – Porta Amostras \rightarrow , com a placa de cultura celular inserida e com os ímãs fixos nas extremidades do porta amostras.....	36
Figura 4 – Placas de cultivo celular sobre suportes de ímãs de neodímio, polo Norte \uparrow (na cor vermelha) e polo Sul \downarrow (na cor azul).....	36
Figura 5 – Placa de cultura sobre ímã de neodímio Polo Norte _(Maior) \uparrow	37
Figura 6 – Microscópio Leica DMI1 no qual foram registradas as fotos das placas dos experimentos de estufa.....	37
Figura 7 – Medição do campo magnético do suporte do ímã de neodímio Polo Norte \uparrow (na cor vermelha).....	38
Figura 8 – Medição do campo magnético do suporte do ímã de neodímio Polo Sul \downarrow (na cor azul).....	38
Figura 9 – Medição do campo magnético do ímã maior de neodímio em formato de disco, que abrangia toda a placa, Polo Norte _(maior) \uparrow	39
Figura 10 – Medição do campo magnético do Porta Amostras \rightarrow	39
Figura 11 – Representação de como foi feita a análise da proliferação com as cinco condições experimentais (1) controle; e as condições com exposição aos campos magnéticos estáticos: (2) Porta Amostras \rightarrow ; (3) Polo Norte \uparrow ; (4) Polo Sul \downarrow ; e (5) Polo Norte _(maior) \uparrow . Foram retiradas fotos nos instantes de 0h e 24h, após exposição a 24h para crescimento em estufa.....	40
Figura 12 – Microscópio Nikon ECLIPSE TE300 com a estrutura de acrílico montada em volta, a fim de manter as condições ótimas de cultivo de células vivas.....	41

Figura 13 – Representação de como foi feita a análise de videomicroscopia com as condições experimentais (1) controle; e (2) Porta Amostras →. Foi realizada a videomicroscopia em 24h.....	41
Figura 14 – Foto do risco feito na placa de cultura de células de fibroblastos NHI3T3 de objetiva 20x feita no microscópio Leica DMi1.....	44
Figura 15 – Os quadrados especiais usados para a realização dos experimentos de “fechamento de ferida”.....	44
Figura 16 – Representação de como foi feita a análise dos experimentos de “fechamento de ferida” com as condições experimentais (1) controle; e (2) Porta Amostras →.....	45
Figura 17 – Imagens representativas dos tempos 0h e 24h para cada uma das diferentes condições experimentais.....	47
Figura 18 – Gráfico da razão de crescimento celular para cada condição experimental, normalizada pela condição controle. Os resultados estão expressos no gráfico como média ± erro padrão de pelo menos 3 diferentes repetições para cada condição experimental. O teste one-way ANOVA seguido do teste de Dunnett’s foi usado. * significa $p < 0.05$	48
Figura 19 – Imagem representativa de uma célula em mitose. Na placa controle registramos o número de 23 células iniciais e 20 mitoses após 24h, e na placa em contato com os campos magnéticos estáticos registramos o número de 68 células iniciais e de 106 mitoses após 24h.....	50
Figura 20 – Número de mitoses ao longo de 24h, nos experimentos controle (losangos brancos) e Porta Amostras → (quadrados roxos), não normalizado.....	50
Figura 21 – Imagens representativas dos momentos 0h e 24h do experimento de videomicroscopia nas condições controle e Porta Amostras →.....	51
Figura 22 – Mitoses acumuladas hora a hora em 24h nas condições controle (losangos brancos e curva preta) e Porta Amostras → (quadrados roxos e curva roxa), normalizados pelos respectivos números de células iniciais em 0h.....	52
Figura 23 – Marcação da posição da célula por hora para as condições controle e Porta Amostras → de duas células nos tempos 0h, 1h, 2h, 4h e 6h.....	53
Figura 24 – Representação esquemática da análise das distâncias para determinação das velocidades tangencial e média para as condições controle e Porta Amostras →.....	54

Figura 25 – Velocidades tangencial e média nas condições controle e Porta Amostras \rightarrow	54
Figura 26 – Representação da análise das direções na migração celular nas condições controle e Porta Amostras \rightarrow em videomicroscopia.....	56
Figura 27 – Gráfico da média dos ângulos θ encontrados nas condições controle e Porta Amostras \rightarrow . Os resultados estão expressos no gráfico como média \pm erro padrão de pelo menos 30 diferentes células para cada condição experimental. ns significa não haver diferença significativa entre os grupos usando o teste t de student.....	56
Figura 28 – Fotos representativas dos ensaios de “fechamento de ferida” nas condições controle e Porta Amostras \rightarrow nos tempos 0h e 24h.....	58
Figura 29 – Fotos representativas da delimitação da área medida nos ensaios de “fechamento de ferida” nas condições controle e Porta Amostras \rightarrow nos tempos 0h e 24h.....	58
Figura 30 - Razão σ entre as áreas das feridas nas condições Porta Amostras \rightarrow e controle para riscos realizados nas direções perpendicular e paralela ao campo magnético. Os resultados estão expressos nos gráficos como média \pm erro padrão de pelo menos 3 diferentes medidas experimentais. “ns” significa não haver diferença significativa entre os grupos usando o teste t de student.....	59
Figura 31 – Fotos representativas dos ensaios de “fechamento de ferida” com o quadrado nas condições controle, Porta Amostras \rightarrow paralelo e Porta Amostras \rightarrow perpendicular nos tempos 0h e 17h.....	61
Figura 32 - Razão σ entre as áreas das feridas nas condições Porta Amostras \rightarrow e controle para riscos realizados nas direções perpendicular e paralela ao campo magnético. Os resultados estão expressos nos gráficos como médias \pm erro padrão de pelo menos 3 diferentes medidas experimentais. “ns” significa não haver diferença significativa entre os grupos usando o teste t de student.....	62

LISTA DE TABELAS

Quadro 1 – Experimentos de videomicroscopia realizados nas condições controle e Porta Amostras → em cultura de células vivas de fibroblastos NIH3T3 durante 24h.....	49
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

σ – Sigma, Desvio padrão.

θ – Ângulo Theta.

ΔU – Variação de energia.

B – Magnitude/intensidade do campo magnético.

CO₂ – Dióxido de carbono.

EDTA – Sal Dihidratado Dissódico.

h – Hora.

nT – Nanotesla.

mT – Militesla.

M(t) – Número de mitoses.

m(t) – Número de mitoses normalizado pelo número inicial de células.

mm – Milímetro.

N – Norte.

ns – Não significativo.

N_0 – É o número de células no campo de observação no instante.

NIH3T3 – Linhagem celular de fibroblastos embrionários de camundongo.

N(t) – Número de células.

PBS – Tampão fosfato-salino.

$R = 100 r$ – Taxa de mitose por 100 células.

r – Número de mitoses por célula por tempo.

S – Sul.

t – Tempo.

T – Tesla.

V – Volume.

χ_m – Susceptibilidade.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Histórico e conceitos gerais de magnetismo.....	19
1.2. Efeitos biológicos de campos magnéticos.....	23
1.3. Motivação.....	30
2 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS.....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1. Cultura de Células.....	34
3.2. Aplicação de campo magnético estático, análise de imagens e videomicroscopia.....	35
3.2.1. Experimentos realizados na estufa de cultivo celular.....	35
3.2.2. Experimentos de videomicroscopia.....	40
3.2.3. Experimentos realizados na estufa de “fechamento de ferida” ou “corte”	42
3.3. Modelo para descrição do número de mitoses como função do tempo.....	43
3.4. Análises estatísticas.....	45
4 RESULTADOS.....	46
4.1 Proliferação de células NIH3T3 aumenta na condição Porta Amostras → mas não apresenta diferenças significativas nas outras condições experimentais usadas.....	46
4.2 Células NIH3T3 crescem de maneira linear e com taxa de crescimento dinâmico maior na condição Porta Amostras →	48
4.3 Células NIH3T3 não modificam velocidade de migração na presença de campo magnético.....	53
4.4 Influência na direção de migração celular de células NIH3T3 na presença de campo magnético.....	55
4.5 “Fechamento de ferida” em monocamadas de células NIH3T3 não é modificado por campo magnético.....	57
4.5.1 Experimentos de “fechamento de ferida” com risco manual.....	57
4.5.2 Experimentos de “fechamento de ferida” com uso do quadrado...60	
5 DISCUSSÃO.....	63
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	69

REFERÊNCIAS.....71

INTRODUÇÃO

1.1. Histórico e conceitos gerais de magnetismo

Para o avanço da ciência são necessárias virtudes e competências, dentre elas a curiosidade, a tenacidade, a resiliência e o trabalho. Também é importante a ousadia pelo saber, como diz o lema em latim, “*Sapere Aude*”, citação que apareceu pela primeira vez na publicação *Epistularum liber primus* do filósofo Horácio, em 20 a.C. (Ferry, 2002). As respostas que buscamos através de experimentos e do método científico muitas vezes geram novas perguntas. Contribuir para elucidar os mecanismos biológicos e processos fisiológicos envolvidos nos efeitos biológicos de campos magnéticos se torna uma das principais motivações deste trabalho.

Atualmente entendemos que magnetismo é uma área de física que estuda os fenômenos magnéticos, podendo ser definido também como o próprio conjunto destes fenômenos. Já o eletromagnetismo pode ser definido como uma área que estuda os fenômenos elétricos e magnéticos (Tipler e Mosca, 2006; Young e Freedman, 2015).

Historicamente sabemos que os fenômenos magnéticos foram observados pela primeira vez pelos gregos, a mais de 2500 anos (Tipler e Mosca, 2006; Young e Freedman, 2015). Tales de Mileto, que viveu entre 580 a.C. e 546 a.C., teria feito experimentos com uma pedra (minério de ferro imantado) que apresentou propriedades de atração magnética. Nesse período foram identificadas então estas pedras com propriedades magnéticas, atualmente chamadas de magnetita (Fe_3O_4) em Magnésia. Atualmente o material dessas pedras pode compor os ímãs permanentes (Beck-Krueger *et al.*, 2011; Tipler e Mosca, 2006; Young e Freedman, 2015).

As propriedades magnéticas também foram estudadas pela primeira vez na China por volta do século III a.C. Também na China, entre os séculos II e I d.C, na dinastia Han, foi descoberta a orientação norte-sul em uma barra magnética. Então, observando as propriedades magnéticas, foi desenvolvida a primeira bússola magnética que se tem registro, em um formato de colher, feita de magnetita, apontando para o sul magnético. A colher dessa bússola gira livremente sobre uma placa de bronze em resposta ao torque geomagnético. Inicialmente foi usada em cerca de 200 a.C. a 250 d.C. para adivinhação e geomancia, e, posteriormente, para navegação. (Carlson, 1975).

Efeitos biológicos de campos magnéticos tem sido observados estudados desde então, a partir dos primeiros relatos de Tales de Mileto sobre o magnetismo no século VI a.C. (Beck-Krueger *et al.*, 2011; Young e Freedman, 2015). Estudos sobre aplicações biológicas para campos magnéticos foram feitos por Paracelso por volta de 1500 d.C. e por Franz Mesmer, que viveu entre 1734 e 1843 (Beck-Krueger *et al.*, 2011).

Em 1600 foi publicada em latim a obra de Willian Gilbert sobre ímãs, denominada “*De Magnete, Magneticisque Corporibus, et de Magno Magnete Tellure*” na qual o autor descreve as características dos ímãs, dos materiais magnéticos e do magnetismo da terra, sendo considerado um dos primeiros a abordar este tema. Ele também descobriu que o planeta Terra é como um ímã, tendo polos norte e sul próximos aos polos geográficos, sendo o polo norte geográfico próximo do polo sul magnético e o polo sul geográfico próximo do polo norte magnético (Gilbert, 1600; Purcell, 1985; Tipler e Mosca, 2006; Young e Freedman, 2015).).

Hans Christian Oersted em 1820 apresentou as primeiras evidências da relação entre o magnetismo e o movimento de cargas elétricas em uma carta em latim, sendo considerado como o descobridor do eletromagnetismo. Ele realizou experimentos com uma bússola, demonstrando que sua agulha poderia ser desviada quando se passava uma corrente elétrica próxima (G., 1921; Oersted, 1820; Tang e Pai, 2021).

Posteriormente, em 29 de agosto de 1831, Michael Faraday descobriu a indução magnética. Os registros dessa descoberta foram relatados em seu caderno de laboratório, com o título “*Experiments on the production of electricity from magnetism*”, com uma descrição detalhada do experimento. Os registros de seu caderno de laboratório foram publicados pela primeira vez em 1936, e atualmente tem os 7 volumes (de 1820 a 1862) reunidos pela edição mais recente de Thomas Martin, de 2008 (Dias e Martins, 2004; Faraday, 1932-1936; Bagnoli e Livi, 2018). Faraday também realizou estudos sobre o diamagnetismo entre 1845 e 1846, e sobre o paramagnetismo em 1855 (Bagnoli e Livi, 2018).

Logo em seguida Joseph Henry, que também havia feito essa descoberta, descobriu o fenômeno eletromagnético de autoindutância, compreendendo que o movimento de um ímã nas vizinhanças de uma espira condutora pode produzir corrente elétrica nessa mesma espira (Henry, 1838).

A principal unidade de medida utilizada para campos magnéticos é o tesla (T), cujo nome é uma homenagem ao cientista Nikola Tesla, que viveu entre 1857 e 1943 (de ARAÚJO, 1999).

As interações elétricas e magnéticas estão relacionadas no eletromagnetismo, e seus princípios são estudados e sintetizados através das equações de Maxwell, publicadas pela primeira vez no artigo “*On Physical Lines of Force*” (Maxwell, 1861).

Ímãs podem produzir campos magnéticos estáticos e possuem polos magnéticos denominados norte e sul. Polos iguais de repelem e polos opostos se atraem. Já um eletroímã é formado por uma bobina elétrica ou solenoide com espiras circulares enroladas agrupadas (Tipler e Mosca, 2006; Young e Freedman, 2015).

O campo magnético é um campo vetorial. O campo elétrico em torno de uma carga elétrica diminui com o quadrado da distância da carga. Já o campo magnético em torno de um dipolo magnético diminui com o cubo da distância do dipolo. Um campo magnético pode ser criado por uma carga puntiforme deslocando-se em velocidade constante (Barnothy, 1964; Young e Freedman, 2015).

As linhas de um campo magnético emitem de um polo magnético, divergindo para seus arredores e convergindo para o outro polo magnético, do polo norte para o polo sul, apontando para fora do polo norte e para dentro do polo sul. Elas são utilizadas para representar os campos magnéticos. Em cada ponto, essas linhas se alinham de forma tangente ao vetor do campo. (Considine, 2006; Purcell, 1985; Tang e Pai, 2021). Para visualizar como essas linhas se comportam, um experimento utilizando limalhas de ferro pode ser realizado, no qual as limalhas vão se reunir, alinhando-se de forma tangente à algumas dessas linhas (Tipler e Mosca, 2006; Young e Freedman, 2015).

Os campos magnéticos estáticos podem ser classificados de acordo com suas intensidades. Campos magnéticos menores que $1mT$ ($B < 1mT$) são considerados “fracos”; campos magnéticos entre $1mT$ e $1T$ ($1mT < B < 1T$), são considerados “moderados”; e campos magnéticos maiores que $1T$ ($B > 1T$), são considerados “intensos” (Zang *et al*, 2017).

O campo magnético da Terra é predominantemente um dipolo axial de magnitude de cerca de 25.000-65.000 nT (0,025-0,065 mT) na superfície da Terra. A área que estuda sobre esse tema é o paleomagnetismo (Hulot *et al*, 2010).

O corpo humano também produz campos magnéticos denominados biomagnéticos. Eles são detectados em várias partes do corpo, dentre elas o cérebro,

o fígado e o coração. No caso dos campos biomagnéticos do coração, estes tiveram seus primeiros registros de detecção em 1963 (Baule e McFee, 1963; Cohen, 1969, 1975; Young e Freedman, 2015).

Os campos magnéticos produzidos pelo corpo humano (biomagnéticos) estão na faixa de nanoteslas (10^{-9} T) a femtoteslas (10^{-15} T), sendo os campos mais intensos os produzidos pelo coração humano (10^{-10} T) e músculos (10^{-11} T) (medidos pela magnetocardiografia e pela magnetomiografia respectivamente). (Araújo, 1999).

Estes campos podem ser medidos através de sensores magnéticos sensíveis, como o *Superconducting Quantum Interference Device* (SQUID), sendo possível a realização de exames como o magnetoencefalograma, o magnetocardiograma, o magnetogastrograma, dentre outros (Araújo, 1999; Sternickel e Braginski, 2006).

O magnetismo pode ser compreendido de forma moderna como um fenômeno quântico, baseado nos conceitos de spin e momento angular, além do momento magnético. As propriedades magnéticas da matéria podem ser definidas principalmente como ferromagnetismo, paramagnetismo, diamagnetismo, ferrimagnetismo e antiferromagnetismo (Tipler e Mosca, 2006; Tang e Pai, 2021).

Os materiais ferromagnéticos contêm domínios microscópicos dentro dos quais os dipolos magnéticos moleculares estão naturalmente alinhados. Nestes materiais é encontrada a magnetização espontânea, diferente de nos materiais paramagnéticos e diamagnéticos. Entretanto, se torna paramagnético se sua temperatura for elevada acima de sua temperatura de Curie (pois esta é a temperatura na qual, quando alcançada, um ímã ou material que seja ferromagnético perde suas propriedades magnéticas, sendo que cada material tem a sua temperatura ou ponto Curie específico). Exemplos de materiais ferromagnéticos são o ferro, o cobalto, o níquel e o gadolínio (Considine, 2006; Barnothy, 1964; Tipler e Mosca, 2006; Tang e Pai, 2021; Young e Freedman, 2015).

Os materiais paramagnéticos possuem dipolos magnéticos atômicos que normalmente não estão alinhados, mas ficam magnetizados quando são expostos a campos magnéticos externos. Exemplos de materiais paramagnéticos são o alumínio, o tungstênio e a platina (Tipler e Mosca, 2006; Tang e Pai, 2021; Young e Freedman, 2015).

O diamagnetismo é um fenômeno que está presente em todos os materiais; porém, não é frequentemente percebido quando os efeitos de ferromagnetismo e paramagnetismo estão presentes. Em materiais diamagnéticos, a aplicação de um

campo magnético externo vai alterar o movimento dos elétrons dos átomos, produzindo indução de dipolos magnéticos no sentido oposto ao do campo externo. Exemplos de materiais diamagnéticos são o silício, o cobre, a prata, o ouro e o Bismuto (Tipler e Mosca, 2006; Tang e Pai, 2021; Young e Freedman, 2015).

O antiferromagnetismo se trata de um alinhamento ordenado e antiparalelo, o que resulta em zero de magnetização, quando nenhum campo magnético é aplicado. Um exemplo de material antiferromagnético é o Óxido de Ferro. Já o ferrimagnetismo é semelhante ao antiferromagnetismo, porém com a diferença de que seus momentos magnéticos que estão alinhados de forma antiparalela não têm a mesma magnitude, resultando em um comportamento semelhante ao dos materiais ferromagnéticos. A magnetita, por exemplo, é considerada um material ferrimagnético (Tang e Pai, 2021).

1.2. Efeitos biológicos de campos magnéticos

Geomagnetismo é a característica da presença de campo magnético no planeta. A terra se comporta como um ímã, um dipolo magnético (Young e Freedman, 2015). Uma vez presente durante o processo de evolução da vida, e que todos os organismos vivos experimentam a ação do campo geomagnético, é natural esperar que essa presença influencie nos seres vivos. Tais seres vivos podem então estar adaptados ao campo geomagnético da terra, ou ainda podem usar da magnetorrecepção e do sentido magnético, como na geolocalização magnética de bactérias magnetotáticas, lagostas, aves migratórias, dentre outros animais (Barnothy, 1964; Mo *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2019; Young e Freedman, 2015).

A geolocalização magnética poderia ser explicada pela presença de biomineralização de nanocristais de magnetita endógenos em diversos seres vivos, como em moluscos, artrópodes, microrganismos e o próprio ser humano (no cérebro humano) (Kirschvink, 1989; Kirschvink, Kobayashi-Kirschvink e Woodford, 1992).

A ausência ou baixa de campos magnéticos (campos hipomagnéticos) pode gerar um estresse oxidativo em organismos, e afetar funções cognitivas de aprendizagem e memória, além de comportamento ansioso. No nível celular, pode afetar organelas e eventos biológicos, tais como a proliferação celular e o desenvolvimento embrionário (Ding *et al.*, 2019; Mo *et al.*, 2013).

Segundo Madeleine e Jeno Barnothy, os efeitos biológicos dos campos magnéticos podem ser classificados em três grupos: grupo sensorial, relacionado com

o desenvolvimento de órgãos ou receptores sensoriais sensíveis aos campos magnéticos, podendo estar relacionado com os comportamentos de animais migratórios através da geolocalização magnética. O segundo grupo é o do estresse, relacionado com condições que pode ocorrer pela exposição aos campos magnéticos de forma cumulativa, gerando modificações diversas nos organismos biológicos. O terceiro grupo é o “grupo do código genético”, ao qual os autores associaram à possíveis alterações genéticas (Barnothy, 1964).

Biomagnetismo pode ser definido como campos magnéticos produzidos por organismos vivos, incluindo o ser humano (de ARAÚJO, 1999). Mas também é a nomenclatura dada à ciência que estuda os campos magnéticos produzidos por organismos vivos. Enquanto a magnetobiologia é a ciência que estuda os efeitos de campos magnéticos externos sobre organismos vivos. Ambas ciências necessitam de proficiência em física e biologia, de forma interdisciplinar e multidisciplinar (Barnothy, 1964).

Evidências demonstram que células, tecidos e organismos vivos podem ser afetados por campos eletromagnéticos fracos e campos magnéticos estáticos, o que pode ser estudado pela magnetobiologia (Binhi, 2000).

A magnetobiologia é a ciência que tem buscado estudar os efeitos biológicos de campos magnéticos sobre organismos vivos diversos, desde bactérias a seres humanos. A maioria destes estudos costuma abordar o efeito de campos magnéticos variáveis como uma forma de onda sinusoidal pura combinada a algum componente estático (Makinistian, 2019).

Um estudo de 2017 demonstra que as reações enzimáticas intracelulares de transferência de elétrons ou de radical íon dependente de spin podem ser via magnetorreceptores biológicos primários em organismos vivos (Letuta *et al.*, 2017).

A bioeletricidade e o bioeletromagnetismo são as áreas da ciência que estudam os fenômenos elétricos e eletromagnéticos presentes em organismos vivos. O primeiro documento escrito sobre bioeletricidade é um hieróglifo egípcio antigo de 4000 a.C. descrevendo um peixe elétrico (Malmivuo e Plonsey, 1995).

Bioeletromagnetismo é uma área interdisciplinar da ciência que examina os fenômenos elétricos e magnéticos que surgem em células, tecidos e órgãos. São estudados os campos magnéticos dentro e fora do corpo, as respostas celulares que são excitáveis à estimulação de campos elétricos e magnéticos, e as propriedades elétricas e magnéticas dos tecidos biológicos (Malmivuo e Plonsey, 1995).

Um componente relacionado ao bioeletromagnetismo se trata das nanopartículas de magnetita endógenas, também chamadas de biomagnetitas ou nanocristais de magnetita de origem biológica. Estas nanopartículas seriam formadas pelo próprio organismo vivo. Podem estar envolvidas por um magnetossomo, uma organela celular, como ocorre em bactérias magnetotáticas, que são bactérias que possuem nanocristais de magnetita em seu interior, possibilitando que elas se alinhem a campos magnéticos externos (Almeida *et al.*, 2013; Cypriano *et al.*, 2019, 2020; Vali *et al.*, 2004; Werckmann *et al.*, 2017). E as funções da presença destas biomagnetitas nestes organismos, segundo alguns autores, podem estar envolvidas na magnetorrecepção e/ou geolocalização magnética em animais diversos, desde microrganismos até aves e mamíferos (Wiltschko *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2019). Em seres humanos existem evidências de que biomagnetitas que estariam localizadas no cérebro, na forma de biomineralização de nanocristais de magnetita (Hammond *et al.*, 2021; Kirschvink, Kobayashi-Kirschvink e Woodford, 1992; Maher, 2019; Maher *et al.*, 2016; Schultheiss-Grassi, Wessiken e Dobson, 1999; Wang *et al.*, 2019). Em 1981 um estudo teria encontrado indícios da presença de cristais de magnetita em glândulas adrenais humanas (Kirschvink, 1981). Em 1997 foram encontradas evidências da presença de magnetita biogênica em fígado, coração e baço humano (Grassi-Schultheiss, Heller e Dobson, 1997). Em 2015 foi encontrada a presença de óxidos de ferro em baço humano (incluindo a magnetita), o que os autores sugerem que representem uma biomineralização (Kopáni *et al.*, 2015). Já em 2019 um estudo encontrou a presença de nanopartículas de magnetita em amostras de pele do pescoço (região cervical) de humanos (Murros *et al.*, 2019).

Essas nanopartículas de magnetita podem ser também um recurso para a identificação dos chamados “fósseis magnéticos”, sendo um biomarcador de vida (Bazylinski e Frankel, 2004; Chang e Kirschvink, 1989; Cypriano *et al.*, 2020).

Atualmente encontramos um número variado de propostas terapêuticas que envolvem campos magnéticos, que podem ser chamadas de terapias magnéticas. Estas práticas são diversas, com princípios e aplicações específicas para cada abordagem, desde a magnetoterapia (com uso de ímãs de ferrite e neodímio) e a eletromagnetoterapia (com uso campos eletromagnéticos de bobinas), que possuem propostas de tratamento voltadas para dores, inflamações e regeneração (Buchachenko, 2014; Keskin *et al.*, 2019; Pesqueira, Costa-Almeida e Gomes, 2018; Zhang *et al.*, 2020), até as terapias magnéticas transcranianas realizadas por

neurologistas, voltadas para condições neurológicas, comportamentais e de saúde mental (Buchachenko, 2014). Mas também existe muita divergência sobre os fundamentos de seus efeitos biológicos e seus métodos de aplicação (Markov, 2015), o que justifica a demanda de mais estudos básicos que investiguem seus mecanismos de ação, ainda a nível celular.

Outras aplicações já envolvem o uso de nanopartículas magnéticas na engenharia biomédica, em aplicações no tratamento através de hipertermia (tratamento de câncer) e auxiliando no direcionamento de medicamentos (Kilinc, Dennis e Lee, 2016; Young e Freedman, 2015). Além das aplicações em regeneração neuronal, em casos de lesão de medula espinhal, com o direcionamento de crescimento de neuritos através de estimulação mecanoquímica (Kilinc, Dennis e Lee, 2016).

Ferramentas de estudo e investigação como pinças magnéticas também podem ter aplicações na área de terapias celulares, neurais e direcionadas ao tratamento de câncer. Pois as pinças magnéticas podem ser utilizadas para mecanotransdução, estimulação mecânica gerando sinalizações bioquímicas que podem gerar efeitos fisiológicos, em células *in vitro* e associadas a manipulação de nanopartículas magnéticas. Podem ser usadas para medição e estimulação extra e intracelular (Kilinc, Dennis e Lee, 2016; Wang *et al.*, 2020).

Sobre os mecanismos que envolvem os efeitos biológicos dos campos magnéticos, identificar os magnetorreceptores em organismos vivos é um dos principais desafios na compreensão desses bioefeitos que encontramos na literatura científica (Letuta *et al.*, 2017).

Em 1969, no segundo volume de seu livro, Barnóthy apresentou, em alguns capítulos, a sugestão de que os campos magnéticos poderiam ser usados no tratamento de doenças (Barnóthy, 1969). Entretanto, ainda hoje, estudos sobre o tema bioeletromagnetismo e suas ramificações (biomagnetismo, bioeletricidade e magnetobiologia) encontram barreiras em seu desenvolvimento, o que pode ser explicado por essa temática se encontrar na fronteira multidisciplinar entre biologia, física e medicina.

Ainda assim, desde 1988 o cientista Valery Vasilyevich Lednev desenvolve estudos sobre bioeletromagnetismo e sobre os efeitos biológicos de campos magnéticos fracos, e apresentou uma proposta de mecanismo para descrever os efeitos dos campos magnéticos combinados a algumas reações bioquímicas

dependentes de cálcio (Belova e Panchelyuga, 2010; Lednev, 1991). Estudos associando o íon cálcio (Ca^{2+}) ao efeito de campos magnéticos e terapias magnéticas têm sido desenvolvidos desde então, abordando a influência da exposição de campos magnéticos sobre o estímulo intracelular de Ca^{2+} (Escobar *et al.*, 2020; Gmitrov, 2020; Pesqueira, Costa-Almeida e Gomes, 2018; Tay *et al.*, 2016; Tong *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2020).

Um estudo publicado em 2016 demonstrou que a estimulação de força magnética combinada com o uso de nanopartículas magnéticas desencadeou um influxo de cálcio no córtex cerebral. O mesmo estudo sugeriu a participação de canais iônicos mecanossensíveis nesse processo (Tay *et al.*, 2016).

Em 1992 Joseph Kirschvink encontrou evidências de biomineralização de cristais de magnetita no cérebro humano, dentro das células neuronais (Kirschvink, Kobayashi-Kirschvink e Woodford, 1992), e em 2019 um artigo apresentou evidências de magnetorrecepção em seres humanos (Wang *et al.*, 2019). Atualmente também têm sido desenvolvidos estudos que incluem o uso de nanopartículas de magnetita na medicina diagnóstica (Grillone e Ciofani, 2017; Maher *et al.*, 2016), medicina regenerativa (Falconieri, Vincentiis, De e Raffa, 2019; Kolesov *et al.*, 2017), no tratamento por hipertermia e na possibilidade de uso em tratamentos de alguns cânceres (Grillone e Ciofani, 2017; Kilinc, Dennis e Lee, 2016; Roet *et al.*, 2019), assim como no controle de canais iônicos de neurônios, despolarização da membrana celular e aumento de níveis de Ca^{2+} (Foletti *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2010; Tay *et al.*, 2016).

Encontramos diversos trabalhos que abordam os efeitos biológicos dos campos eletromagnéticos *in vitro* e *in vivo*. Fraser McDonald, em 1993, demonstrou que fibroblastos quando expostos a campos magnéticos estáticos (0,45 T) utilizando ímãs localizados a 0,5 cm de distância, por 1, 3, 5, 7 e 10 dias, mostraram uma maior captação de timidina e prolina, o que implicou em aumento da proliferação celular e também em aumento da atividade sintética, do colágeno em particular. No mesmo estudo, o autor não observou o mesmo resultado em osteoblastos (McDonald, 1993). Também em 1993 foi demonstrado que uma exposição a campos magnéticos sinusoidalmente variáveis de frequência 100Hz e amplitude 700 μT por 24h mostraram um aumento das taxas de proliferação celular de fibroblastos de embrião de galinha (Parola, Porat e Kiesow, 1993).

Em 1997 Schimmelpfeng e Dertinger demonstraram que um campo eletromagnético de 50Hz e 2mT foi capaz de gerar efeito na proliferação de células de fibroblastos em cultura. Entretanto os autores concluíram que tais efeitos foram possíveis principalmente através do efeito dos campos elétricos induzidos devido à variação temporal dos campos magnéticos e não propriamente pelos campos magnéticos aplicados (Schimmelpfeng e Dertinger, 1997).

Em 1998, DiCarlo, Farrefell e Litovitz demonstraram a influência de campos eletromagnéticos de 60Hz e 4, 6, 8 e 10 μ T por 96h em embriões de galinha, quando expostos a anóxia. Os autores observaram que os campos eletromagnéticos promoveram um aumento da sobrevivência dos embriões, que foi de 39,6% no controle e 68,7% no exposto ao campo (DiCarlo, Farrell e Litovitz, 1998).

Campos magnéticos estáticos também promovem aumento de proliferação de células endoteliais (Martino, 2011; Martino *et al.*, 2010; Okano *et al.*, 2006). Assim como campos magnéticos pulsados aceleram proliferação e migração de células endoteliais cardíacas (Li *et al.*, 2015; Martino, 2011; Martino *et al.*, 2010; Okano *et al.*, 2006).

Um estudo usando campos magnéticos estáticos de 120mT avaliou os efeitos sobre células endoteliais vasculares em estágio inicial da formação do túbulo capilar endotelial. Após experimentos por 4, 7 e 10 dias os pesquisadores obtiveram os resultados de aumento de densidade e de área dos túbulos, mas sem influência sobre a orientação celular pela exposição aos campos magnéticos (Okano *et al.*, 2006).

Campos eletromagnéticos pulsados geraram efeitos benéficos na diferenciação osteogênica, promovendo proliferação celular e reduzindo a atividade inflamatória em osteoblastos, condrócitos e fibroblastos sinoviais, mediado por receptores de adenosina (Ongaro *et al.*, 2014).

Campos magnéticos podem ainda influenciar na proliferação e diferenciação de células neurais em cultura (Foletti *et al.*, 2013). Uma revisão publicada em 2011 abordou os efeitos de campos magnéticos na regeneração nervosa periférica e apresentou dados que indicavam a formação de neuritos em tecido nervoso periférico crescendo em direção paralela aos campos magnéticos estáticos. Observaram também que culturas celulares adicionadas de fator de crescimento nervoso (NGF) obtiveram um crescimento significativo de $(16,9 \pm 1,1)\%$ em relação ao grupo controle quando expostas a campos magnéticos de intensidades de 4,35 a 8,25 μ T por 23h (Beck-Krueger *et al.*, 2011).

Outro trabalho publicado em 2015 demonstrou que o uso de gel de colágeno alinhado após exposição de campos magnéticos de 8T era capaz de promover um significativo aumento na regeneração nervosa em número e diâmetro de axônios, em modelos *in vitro* e *in vivo* (Eguchi *et al.*, 2015). *In vivo* o tratamento com campos eletromagnéticos de baixa frequência e baixa intensidade (VLIFE) mostraram-se benéficos para a reabilitação de lesão neurológica de medula espinhal em ratos (Segal e Segal, 2016). Os mesmos autores já tinham demonstrado o benefício da mesma técnica para tratamento após acidente vascular cerebral, promovendo a neuroplasticidade (Segal *et al.*, 2016).

Um estudo de 2001 com células de fibroblastos NIH3T3 demonstrou efeito dos campos magnéticos de frequência extremamente baixa sobre as junções comunicantes intracelulares, gerando uma inibição dessas junções em 50% a 60%. A exposição foi feita por 24h a 50 Hz e 0,8 mT. Nesse estudo os autores sugerem que o principal mecanismo envolvido neste efeito observado é a hiperfosforilação da conexina 43, uma proteína componente das junções comunicantes (Hu *et al.*, 2001).

Um trabalho de 2015 avaliou o efeito de exposição a campos magnéticos sobre as junções comunicantes do tipo GAP em células, uma vez que elas são importantes no processo de crescimento celular e que sua perda ou interrupção estaria relacionada com um mecanismo de carcinogênese. Foi realizada a exposição por 24h de células de fibroblastos de camundongos NIH3T3 a campos magnéticos de 50Hz a 0,4 ou 1mT, e nessas condições foi demonstrado que não ocorreu diferença significativa entre o grupo controle e o grupo exposto aos campos magnéticos (Percherancier *et al.*, 2015).

Um estudo demonstrou efeitos de campos magnéticos pulsados na proliferação de células endoteliais microvasculares cardíacas, que estão relacionadas com a angiogênese cardíaca. A exposição foi feita com campos magnéticos na frequência de 15Hz e a intensidade de 1,8 mT, gerando um aumento de proliferação e migração no tipo celular estudado, tendo um aumento de 2 vezes no fator de crescimento de fibroblastos. Os autores correlacionaram esses efeitos com a ação sobre as mitoses e junções comunicantes celulares (Li *et al.*, 2015).

Outro estudo sobre o ATP intracelular em células do tipo adrenais PC12, evidenciou efeitos com a exposição a campos magnéticos estáticos de 1T (em 1h e 6h, aumentando o ATP, relacionado com a membrana mitocondrial potencial) e 9T

(em 6h, diminuindo o nível de ATP nas células). Entretanto os experimentos com 0,26 T e 0,5 T não apresentaram efeitos significativos (Wang *et al.*, 2018).

Já de acordo com um artigo publicado em 2020 na revista *Bioelectromagnetics*, campos magnéticos podem aumentar a proliferação de condrócitos e promover maior síntese da matriz extracelular da cartilagem articular (Escobar *et al.*, 2020). Foi demonstrado que um campo magnético de 2 mT, gerado por bobina e aplicado por 3h a cada 6h durante 8 dias, era capaz de promover aumento na proliferação de condrócitos primários de ratos. No mesmo trabalho, os autores também indicaram um aumento na síntese de glicosaminoglicanos após exposição aos campos magnéticos (Escobar *et al.*, 2020).

Também em 2020 foi publicado um artigo que apresentou resultados sobre a exposição de campos eletromagnéticos de diferentes intensidades e tempos sobre fibroblastos dérmicos em cultura. Os autores sugeriram ser possível atingir a melhor condição para regeneração de feridas e lesões cutâneas, quando se diminuía a intensidade de exposição de 2 mT para 0,5 mT e aumentava o tempo de exposição aos campos eletromagnéticos de 24h para 72h (Naghizadeh *et al.*, 2020).

Diante de todo esse contexto, o conhecimento sobre os efeitos de ação de campos magnéticos estáticos externos sobre células e organismos vivos adquire relevância na busca pelos mecanismos envolvidos.

1.3. Motivação

A motivação para este trabalho vem de minha própria atuação em consultório, com atendimento na área clínica. Atendendo como biomédica acupunturista desde 2015 (Medicina Tradicional Chinesa), atuando com a acupuntura associada a uma técnica chamada magnetoterapia, observei diversos resultados interessantes e promissores, com benefícios da aplicação da técnica para os pacientes.

Biomédicos podem ser habilitados em Acupuntura, conforme os termos da Resolução do CFBM nº 02 de 25 de março de 1995. Dessa forma, são habilitados para atender com Acupuntura e técnicas correlatas da Medicina Tradicional Chinesa (MTC), incluindo Magnetoterapia e Eletromagnetoterapia, conforme a Normativa CFBM nº 01/2012 e a Normativa CFBM nº 001/2016, de 28 de janeiro de 2016.

A magnetoterapia com ímãs é uma prática terapêutica que tem o princípio de tratar de forma complementar algumas condições de saúde, relacionadas ao tratamento de dores, lesões e inflamações, além de ser aplicada em pontos de acupuntura. Os ímãs geralmente utilizados são feitos de ferrite ou neodímio, como mostra a Figura 1, e sua magnitude aplicada nos pontos é principalmente de cerca de 600 a 3000 gauss (60 a 300 mT) (Bansal, 1989; Lima, 2016; Souza, 2020; Silvério-Lopes, 2013), ou, também, de 300 a 5000 gauss (30 a 500 mT) (Ratterman, 2002).



Figura 1 – Ímãs de ferrite e neodímio que geralmente são utilizados em tratamento de magnetoterapia associado à acupuntura.

Dentre as diversas aplicações da magnetoterapia, uma delas é o tratamento de lesões (que podem causar hematomas) (Lima, 2016; Souza, 2020). Hematoma é uma situação na qual ocorre o acúmulo de sangue em uma região do corpo, tecido ou órgão, apresentando variação de coloração na pele, e sendo originado em geral após uma lesão (Kim, 2012; Randeberg, 2007; Sena, 2013; Vidovic, Milanic e Majaro, 2015). O hematoma recente costuma ser vermelho, pois o sangue é rico em oxigênio. Com a perda do oxigênio com o tempo, a cor do hematoma começa a escurecer (azulado e arroxeadado). Por fim, o hematoma na pele apresenta uma cor que varia do esverdeado, acastanhado e amarelado, e vai desaparecendo de forma lenta, podendo levar vários dias para retomar o tom natural da pele (Li, 2020; Sena, 2013; Vidovic, Milanic e Majaro, 2015).

Como um exemplo, trago o caso clínico a seguir:

Paciente mulher, 54 anos, apresentou hematoma de cerca de 20x14 cm, após lesão da coxa direita por queda da própria altura. Foi realizada a aplicação de ímãs locais segundo os fundamentos da magnetoterapia associada à prática da Medicina

Tradicional Chinesa (Acupuntura). Após tratamento com magnetoterapia, a paciente teve recuperação do hematoma em 7 dias, como pode ser observado na Figura 2.



Figura 2 – Fotos dos dias 1, 3 e 7 de evolução de hematoma, após aplicação de magnetoterapia com ímãs de ferrite de 600 gauss (60 mT). Paciente mulher, 54 anos, apresentou hematoma de cerca de 20x14 cm, após lesão por queda, na coxa direita.

Através da observação de resultados clínicos, em consultório, com o atendimento com a prática da magnetoterapia, surgiram questionamentos sobre a natureza dos possíveis efeitos biológicos de campos magnéticos estáticos (através de ímãs) que estariam envolvidos, e possíveis mecanismos de ação que poderiam estar atuando no organismo, tecidos e células.

A literatura acadêmica atual é relativamente controversa sobre esse assunto, ainda que indique a presença de efeitos biológicos de campos magnéticos. Dessa forma, o tema de pesquisa foi escolhido, e buscamos analisar os efeitos biológicos da exposição a campos magnéticos estáticos em células vivas, especialmente no caso dos efeitos sobre células de fibroblastos 3T3. Campos magnéticos estáticos foram escolhidos por serem os utilizados na prática clínica da magnetoterapia, e serem menos pesquisados que a aplicação de campos eletromagnéticos por bobinas.

2 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

Este trabalho tem como objetivo geral abordar sobre os efeitos da exposição de campos magnéticos estáticos externos de diferentes sentidos e magnitudes sobre fibroblastos em cultura.

Como objetivos específicos, propomos verificar, o efeito de campos magnéticos estáticos sobre células vivas em cultura da linhagem celular fibroblastos NIH3T3. Pretendemos reconhecer possíveis diferenças em crescimento e migração celulares, caracterizando possíveis correlações biofísicas entre a exposição de campos magnéticos estáticos e o aumento de mitoses e mudanças no padrão de motilidade de células em cultura.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Equipamentos e cultura de células

Os equipamentos e materiais utilizados na realização dos experimentos foram: microscópios Leica DMI1 e Nikon ECLIPSE TE300 (com estruturas preparadas para simular um ambiente ótimo de cultura de células nesses microscópios – temperatura de 37°C e atmosfera com 5% de CO₂); um gaussímetro; ímãs permanentes de liga de neodímio de diferentes magnitudes; um porta amostras; uma bússola magnética; estufa de cultivo celular, geladeira, autoclave; capelas de fluxo laminar; centrífuga; câmara de Neubauer; frascos e placas para cultura celular; tubos falcon; micropipetas; ponteiras; becker de vidro.

Os ímãs de diferentes magnitudes foram aferidos com o auxílio de um gaussímetro TMAG- V2 (GLOBALMAG, São Paulo, Brasil). Foi construído um Porta Amostras sob medida para a fixação dos ímãs nas laterais da amostra (placa de cultivo celular), sem o risco dos ímãs se moverem (Figura 1). O campo magnético gerado no centro do Porta Amostras (centro da placa de cultura) foi aferido em magnitude de (36,6 ± 0,2) mT. Com o auxílio de uma bússola magnética e do gaussímetro, identificamos os polos magnéticos de cada um dos ímãs.

Para a cultura foram utilizadas células da linhagem celular de fibroblastos murinos NIH3T3 (ATCC® CCL-92™); meio de cultura celular DMEM-F12; soro de bezerro; enzima tripsina; tampão fosfato-salino (PBS) com ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA).

Foram descongeladas células do tipo fibroblastos da linhagem NIH3T3, e cultivadas em meio de cultura DMEM-F12, suplementado com 10% de soro de bezerro, 2mM de L-glutamina e 1% de penicilina e estreptomicina. As células em cultivo foram mantidas em estufa de cultura de células e monitoradas para crescerem em condições ótimas de cultivo (temperatura 37°C e atmosfera de 5% de CO₂). Para a preparação de amostras para os experimentos, cultivamos células em placas de cultura circular de 35mm de diâmetro. Nas etapas de contagem celular utilizamos a câmara de Neubauer. Todos os procedimentos com as células foram realizados em capelas de fluxo laminar. Para a remoção das células da garrafa para o repique/passagem de células usamos uma solução de 0,5% da enzima tripsina diluída em PBS ou o PBS com 0,02% de EDTA para então centrifugarmos e

ressuspendermos as células. O meio para cultivo celular, o soro de bezerro, a enzima tripsina e o PBS com EDTA foram preservados em geladeira.

3.2 Aplicação de campo magnético estático, videomicroscopia e análises de imagens

3.2.1. Experimentos de proliferação celular realizados na estufa de cultivo de células

Foram realizados experimentos em estufa de cultivo celular aplicando campos magnéticos estáticos de diferentes magnitudes e sentidos em culturas de fibroblastos NIH3T3. Placas circulares de 35mm de diâmetro contendo 150 mil células foram expostas por 24h aos campos magnéticos estáticos e foram registradas imagens nos instantes 0h e 24h.

Os experimentos foram realizados nas condições: (1) controle (ausência de campos magnéticos); (2) Porta Amostras \rightarrow , com campos magnéticos gerados por dois ímãs de neodímio nas laterais de extremidades opostas da placa de amostra, de magnitude de $(36,6 \pm 0,2)$ mT no centro da placa (Figura 3); e nas condições nas quais o ímã de neodímio foi colocado abaixo da placa nas direções (3) Polo Norte \uparrow , de magnitude de (325 ± 3) mT (Figura 4); (4) Polo Sul \downarrow , de magnitude de (396 ± 4) mT (Figura 2); e (5) um ímã maior de neodímio em formato de disco, que abrangia toda a placa, Polo Norte_(maior) \uparrow e magnitude de (280 ± 1) mT (Figura 5). Foram feitas até 8 fotos de cada condição nos instantes 0h e 24h, usando o sistema representado na Figura 6, e como pode ser visto na Figura 11.

As medidas de campo magnéticos foram aferidas com o auxílio de um gaussímetro, como demonstrado nas figuras 7, 8, 9 e 10.

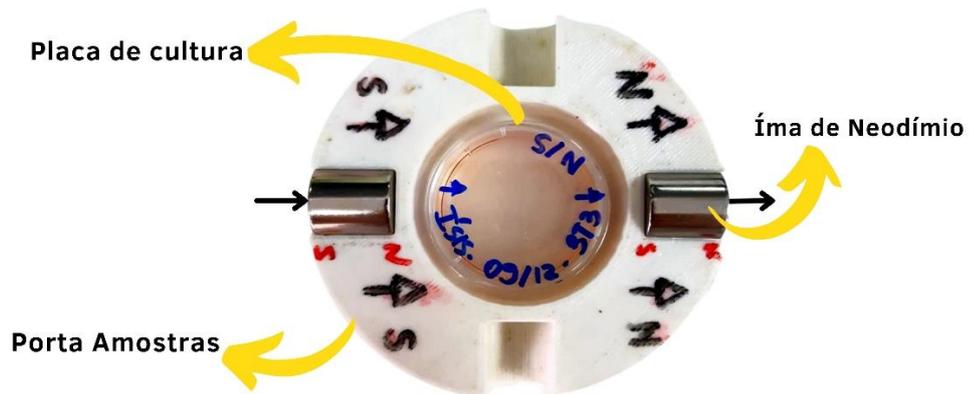


Figura 3 – Porta Amostras \rightarrow , com a placa de cultura celular inserida e com os ímãs fixos nas extremidades do porta amostras.

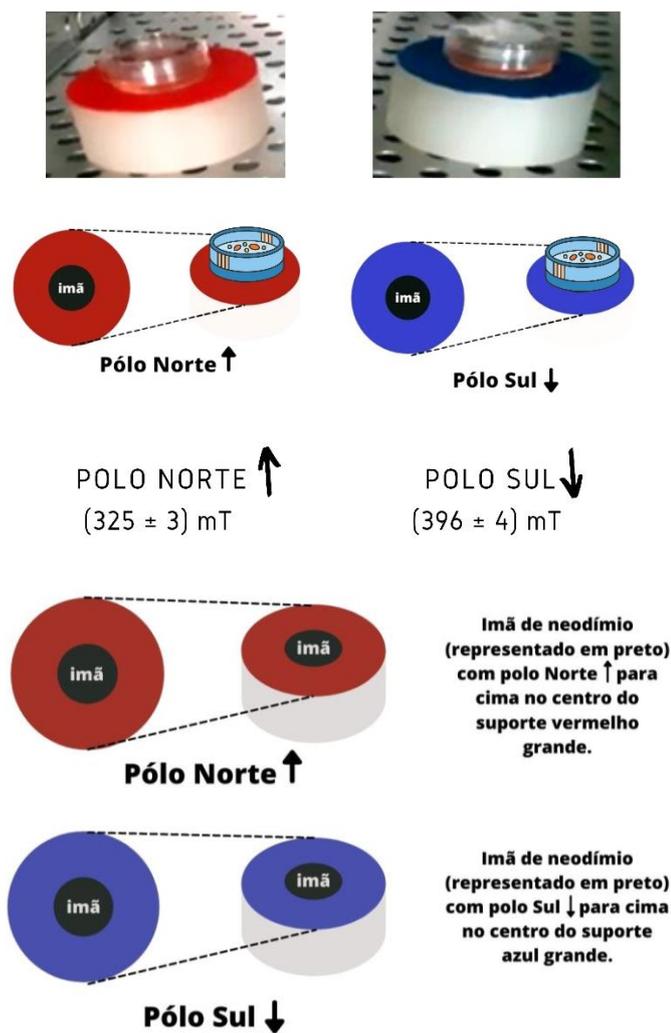


Figura 4 – Placas de cultivo celular sobre suportes de ímãs de neodímio, polo Norte \uparrow (na cor vermelha) e polo Sul \downarrow (na cor azul).

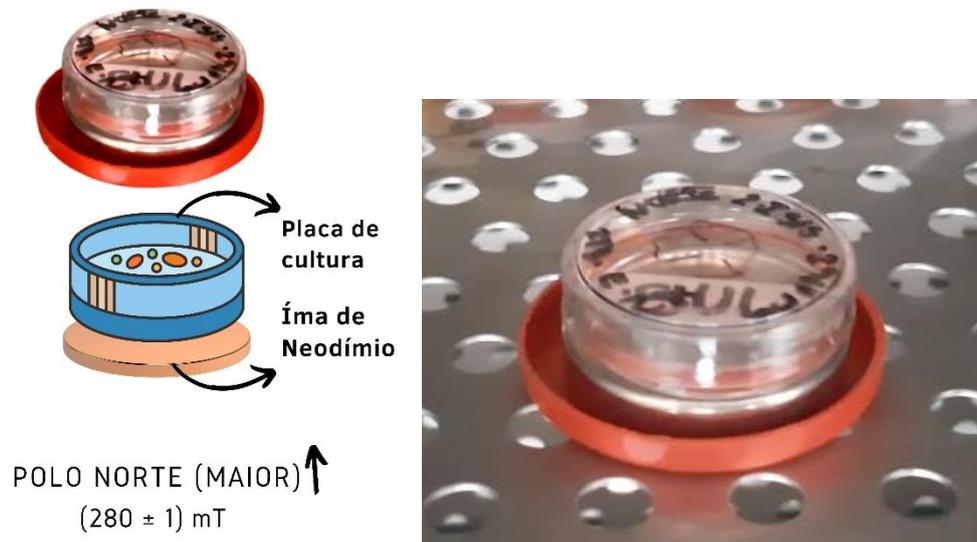


Figura 5 – Placa de cultura sobre ímã de neodímio Polo Norte_(Maior) ↑ .

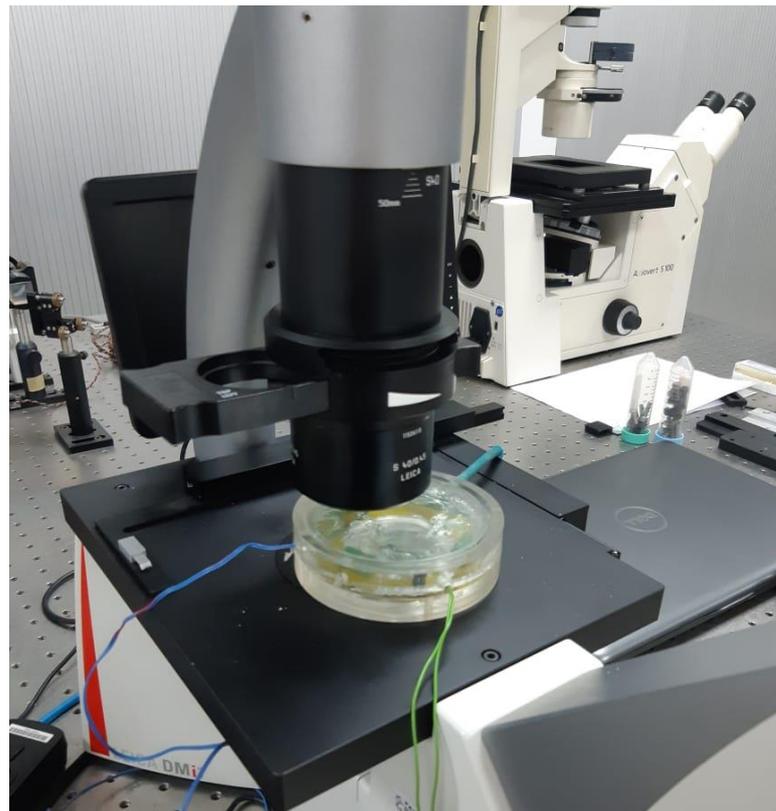
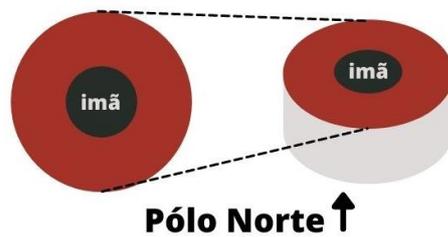
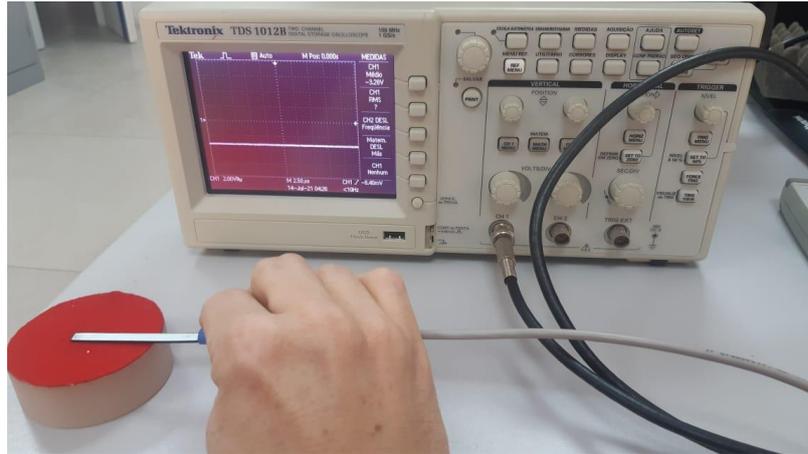
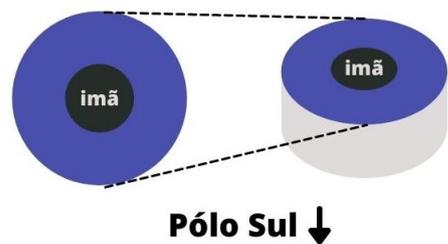
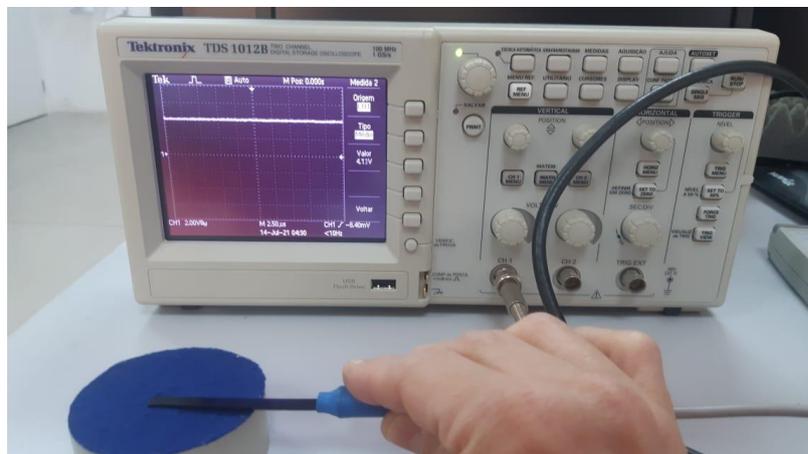


Figura 6 – Microscópio Leica DMI1 no qual foram registradas as fotos das placas dos experimentos de estufa.



**Ímã de neodímio
(representado em preto)
com polo Norte ↑ para
cima no centro do
suporte vermelho
grande.**

Figura 7 – Medição do campo magnético do suporte do ímã de neodímio Polo Norte
↑ (na cor vermelha).



**Ímã de neodímio
(representado em preto)
com polo Sul ↓ para cima
no centro do suporte
azul grande.**

Figura 8 – Medição do campo magnético do suporte do ímã de neodímio Polo Sul ↓
(na cor azul).

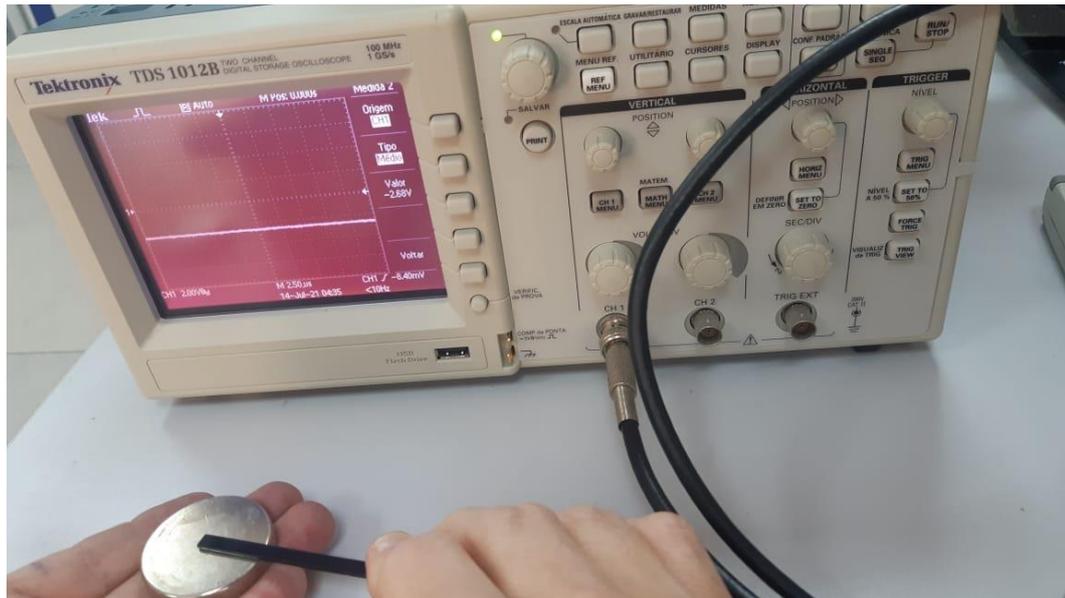


Figura 9 – Medição do campo magnético do imã maior de neodímio em formato de disco, que abrangia toda a placa, Polo Norte_(maior) ↑ .

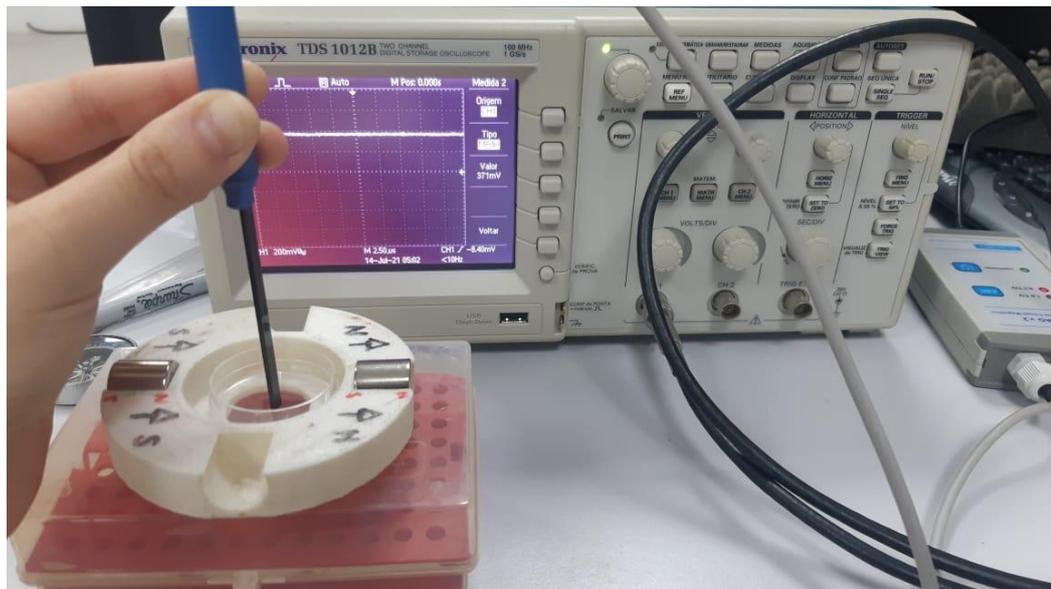


Figura 10 – Medição do campo magnético do Porta Amostras →.

PROLIFERAÇÃO



Figura 11 – Representação de como foi feita a análise da proliferação com as cinco condições experimentais (1) controle; e as condições com exposição aos campos magnéticos estáticos: (2) Porta Amostras \rightarrow ; (3) Polo Norte \uparrow ; (4) Polo Sul \downarrow ; e (5) Polo Norte_(maior) \uparrow . Foram retiradas fotos nos instantes de 0h e 24h, após exposição a 24h para crescimento em estufa.

3.2.2 Experimentos de proliferação celular e motilidade por videomicroscopia

Foram realizados experimentos com a exposição de campos magnéticos estáticos sobre as células vivas em cultura. Preparamos inicialmente uma cultura de células de fibroblastos NIH3T3 e montamos para cada data de experimento duas placas de cultura de células, nas quais adicionamos 3 ml de meio de cultura com 10% de soro de bezerro. Cada placa continha 300 mil células vivas, contagem feita através da câmara de Neubauer.

Após 24h de plaqueamento e cultura, transferimos essas placas para o microscópio e realizamos o experimento que consiste em colocar cada placa de cultura celular, na condição controle (sem contato com campos magnéticos estáticos) e na condição Porta Amostras \rightarrow (em contato com o campo magnético estático), em observação no microscópio NIKON ECLIPSE TE300. Para o cultivo das células no microscópio, o mesmo foi adaptado com câmaras capazes de controlar a temperatura em 37°C e a concentração de CO₂ em 5%, condições ótimas para a manutenção de células em cultura, como demonstrado na Figura 12. Ao longo das 24h seguintes, foram registradas 1440 imagens de um campo previamente escolhido, uma imagem

por minuto, produzindo um vídeo com as imagens obtidas, como pode ser visto na Figura 13. Esses vídeos foram analisados para se determinar a proliferação celular, as velocidades média e tangencial de migração das células e o ângulo de migração celular. Maiores detalhes de como cada análise experimental foi realizada serão descritos antes de cada resultado.



Figura 12 – Microscópio Nikon ECLIPSE TE300 com a estrutura de acrílico montada em volta, a fim de manter as condições ótimas de cultivo de células vivas.

VIDEOMICROSCOPIA

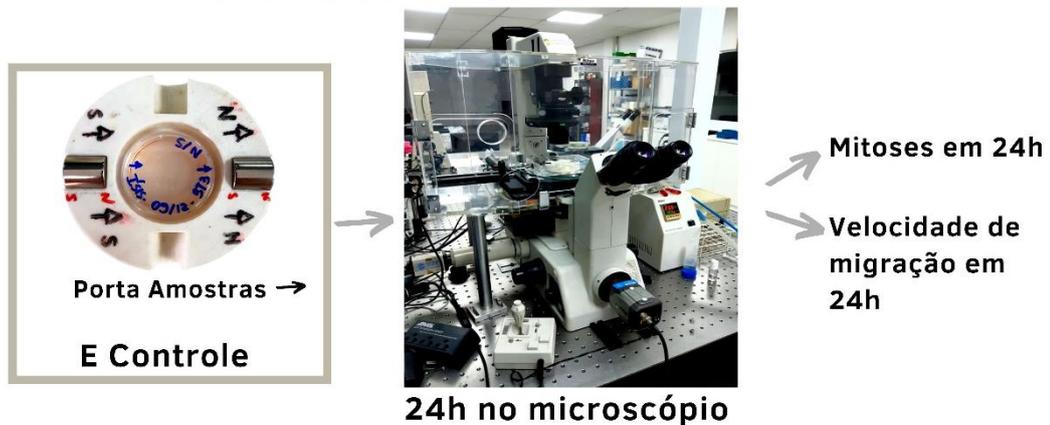


Figura 13 – Representação de como foi feita a análise de videomicroscopia com as condições experimentais (1) controle; e (2) Porta Amostras →. Foi realizada a videomicroscopia em 24h para avaliar mitoses e velocidade de migração.

3.2.3 Modelo para descrição do número de mitoses como função do tempo

Para as condições experimentais descritas na sessão anterior, observamos que o número de mitoses $M(t)$ aumenta como função do tempo t . Para caracterizar esse comportamento, modelamos o aumento do número de células na amostra como exponencial, desconsiderando possíveis células que entram ou saem do campo de observação. Nesse modelo assumimos que as células não têm limitação nem de espaço, nem de alimento enquanto a cultura cresce. O número de células $N(t)$ em função do tempo obedece a uma equação diferencial simples de crescimento exponencial:

$$\frac{dN(t)}{dt} = rN(t), \quad (1)$$

onde r é o número de mitoses por célula por tempo. A solução da equação diferencial acima leva ao resultado:

$$N(t) = N_0 e^{rt}, \quad (2)$$

onde N_0 é o número de células no campo de observação no instante $t = 0$, início do experimento.

O número de mitoses em função do tempo é dado por:

$$M(t) = N(t) - N_0. \quad (3)$$

O número de mitoses normalizado pelo número inicial de células, $m(t)$, é então dado por:

$$m(t) = \frac{M(t)}{N_0} = e^{rt} - 1. \quad (4)$$

Nos experimentos temos $m(t) \propto t$, isso é indicativo de que $rt \ll 1$. Neste caso podemos fazer uma expansão em série de Taylor da função exponencial, retendo os dois primeiros termos para encontrar:

$$m(t) = rt. \quad (5)$$

Encontramos os valores de r para as situações testadas, com e sem campo magnético na amostra.

3.3 Experimentos de “fechamento de ferida” ou “corte” em monocamada de células NIH3T3

Foram realizados experimentos de exposição de campos magnéticos estáticos sobre as células vivas em cultura preparando culturas de células de fibroblastos NIH3T3, mas com a realização de um risco adicional na placa de cultura, para avaliar possíveis efeitos na migração coletiva de células através da medição de área, com o objetivo de simular uma ferida e seu fechamento.

Em um primeiro esquema experimental foi realizado um risco na monocamada de células que cresceram na placa de 35mm de diâmetro, após 24h de cultura, com o auxílio de uma ponteira de micropipeta P200 (Figura 14). A placa de cultura foi previamente preparada com uma cultura de 1,5 milhão de células de fibroblastos, crescendo por 24h (aumentamos a concentração de células para alcançar uma monocamada confluyente para a realização do “risco” simulando a “ferida” na placa) e 3 ml de meio de cultura, nas condições de temperatura em 37°C e a concentração de CO₂ em 5%. Após 24h de crescimento da monocamada de células foi feita a realização do risco, e a placa foi lavada com meio de cultura para retirada das células mortas e o meio de cultura foi colocado novamente, mas reduzimos para 0,1% de Soro de Bezerro, buscando reduzir a proliferação para observação da migração. Após esse procedimento, a placa foi exposta por 24h ao campo magnético nas condições controle e Porta Amostras \rightarrow de formas perpendicular e paralela ao campo magnético estático, como pode ser visto na representação da Figura 16.

No segundo esquema experimental foi realizada a cultura de células em um recipiente especial em formato de quadrado com uma barreira central (Figura 15), fixado no centro da placa de cultura celular de 35mm, que após 24h era retirado, deixando um risco central na placa, na região onde a barreira central estava presente. A placa de cultura foi previamente preparada com uma cultura de 50 mil células de fibroblastos em cada lado do quadrado. Após retirado do quadrado, a placa foi exposta

por 17h ao campo magnético nas condições controle e Porta Amostras → de formas paralela e perpendicular, como pode ser visto na representação da Figura 14.

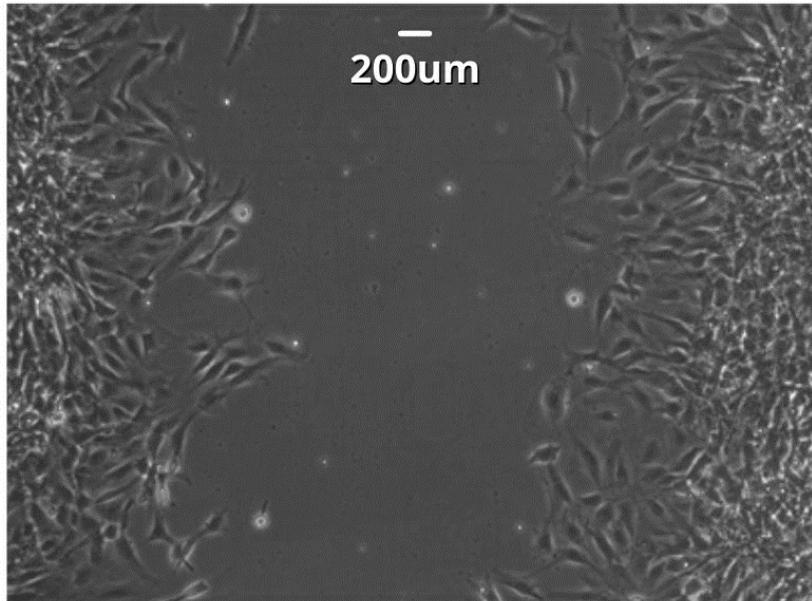


Figura 14 – Foto do risco feito na placa de cultura de células de fibroblastos NHI3T3 de objetiva 20x feita no microscópio Leica DMi1.



Figura 15 – Os quadrados especiais usados para a realização dos experimentos de “fechamento de ferida”.

ENSAIO DE "FECHAMENTO DE FERIDA"



Figura 16 – Representação de como foi feita a análise dos experimentos de “fechamento de ferida” com as condições experimentais (1) controle; e (2) Porta Amostras →.

3.4 Análises estatísticas

Alguns dos dados obtidos são apresentados como média \pm erro padrão. Para os valores de velocidades de migração, foram usados gráficos de *Box-and-Whiskers*. Neles, as caixas retangulares estendem-se do 25^o ao 75^o percentis, com uma linha horizontal preta na mediana e uma cruz preta na média; barras verticais pretas estendem-se do 5^o ao 95^o percentis para todas as condições experimentais; os valores fora dessas faixas são plotados como pontos individuais. Os dados foram analisados usando o software de estatística GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, EUA). Os testes one-way ANOVA seguido do teste de Dunnett's ou o teste t de Student foram usados para comparações estatísticas. O caractere “*” significa $p < 0,05$; “ns” significa não haver diferença estatística entre as condições experimentais. Outras informações são fornecidas nas legendas das figuras.

4 RESULTADOS

4.1 Proliferação de células NIH3T3 aumenta na condição Porta Amostras \rightarrow mas não apresenta diferenças significativas nas outras condições experimentais usadas.

Com o intuito de observar possíveis efeitos de campos magnéticos estáticos em células, foram realizados experimentos aplicando campos magnéticos estáticos de diferentes sentidos e magnitudes sobre células vivas em cultura de fibroblastos NIH3T3. As células foram expostas por 24h aos campos magnéticos estáticos (de ímãs de neodímio) e foram registradas imagens nos tempos 0h e 24h.

Os experimentos foram realizados nas condições: (1) controle; (2) Porta amostra \rightarrow ; (3) Polo Norte \uparrow ; (4) Polo Sul \downarrow e (5) Polo Norte_(Maior) \uparrow . As informações das intensidades dos campos magnéticos de cada condição experimental encontram-se na sessão 3.2.1 de materiais e métodos.

Foram obtidas pelo menos 8 imagens de diferentes campos das placas de cultura de cada condição, nos tempos 0h e 24h (imagens representativas da Figura 17). Todo o experimento foi repetido 3 diferentes vezes.

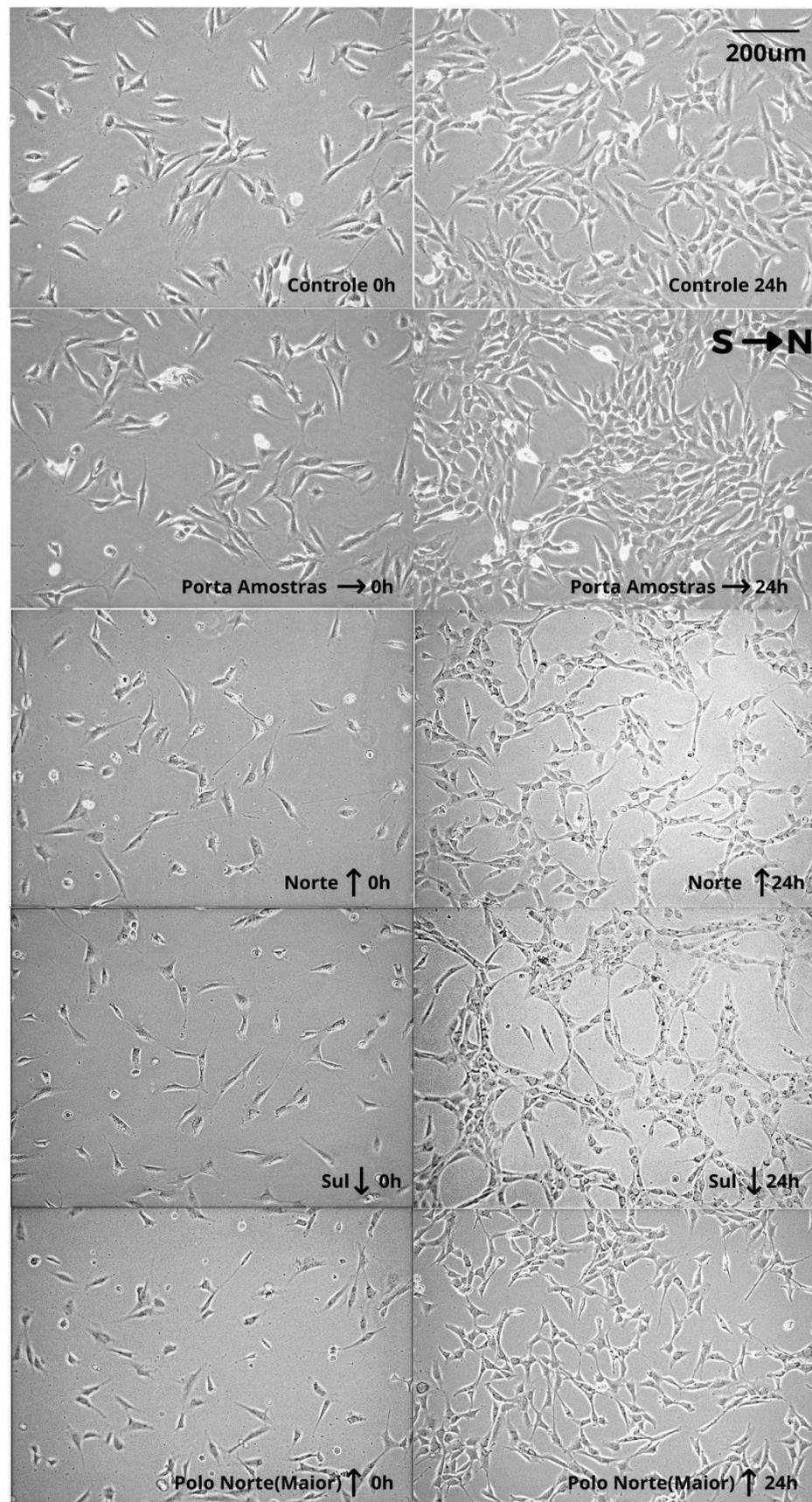


Figura 17 – Imagens representativas dos tempos 0h e 24h para cada uma das diferentes condições experimentais.

Após as análises, nas quais foram contabilizados o número de células que estavam presentes em cada foto, foram feitas as médias para cada condição (controle e expostas aos campos magnéticos de diferentes sentidos e magnitudes) para os tempos de 0h e 24h, e, em seguida, a normalização dos resultados em relação à média contabilizada na condição controle.

Os resultados estão apresentados na Figura 18. “r” representa a média de proliferação celular nas condições expostas aos campos magnéticos, e “r_c” na condição controle.

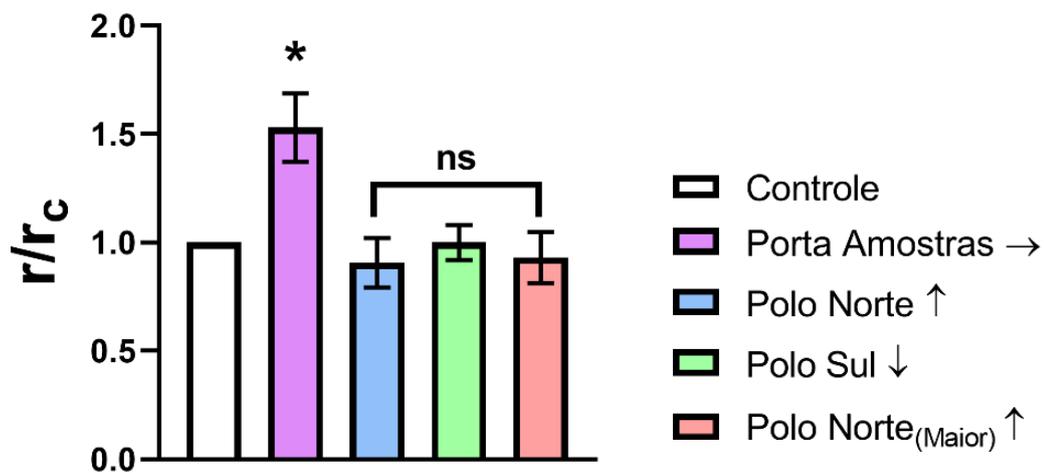


Figura 18 – Gráfico da razão de crescimento celular para cada condição experimental, normalizada pela condição controle. Os resultados estão expressos no gráfico como média ± erro padrão de pelo menos 3 diferentes repetições para cada condição experimental. O teste one-way ANOVA seguido do teste de Dunnett's foi usado. * significa $p < 0.05$, ns significa que não há diferença estatística.

Para a condição Porta Amostras → encontramos $r/r_c = (1.53 \pm 0.16)$; para a condição Polo Norte ↑ $r/r_c = (0.91 \pm 0.11)$; para a condição Polo Sul ↓ encontramos $r/r_c = (1.00 \pm 0.08)$; e para a condição Polo Norte_(Maior) ↑ encontramos $r/r_c = (0.93 \pm 0.12)$ (Figura 18).

Os resultados indicam um aumento significativo na taxa de proliferação celular para a condição Porta Amostras →; entretanto, não foram identificadas diferenças significativas para as outras condições experimentais, quando comparadas com a condição controle.

4.2 Células NIH3T3 crescem de maneira linear e com taxa de crescimento maior na condição Porta Amostras \rightarrow .

Em seguida, nos perguntamos como seria o padrão da curva de crescimento observada na condição Porta Amostras \rightarrow . Para isso, realizamos experimentos dinâmicos acompanhando por videomicroscopia a proliferação celular através das mitoses celulares. Os resultados estão apresentados no Quadro 1. Os experimentos foram realizados nas condições controle e Porta Amostras \rightarrow . Ambos os vídeos foram gerados e analisados contando o número de células inicial e final da região monitorada, assim como o número de mitoses ao longo do tempo (conforme exemplo da Figura 19) durante as 24h (Figura 20).

Condição do Experimento	Número de células (0h)	Número de Mitoses em 24h	Número de células (24h)
Controle	23	20	44
Porta Amostras \rightarrow	68	106	238

Quadro 1 – Experimentos de videomicroscopia realizados nas condições controle e Porta Amostras \rightarrow em cultura de células vivas de fibroblastos NIH3T3 durante 24h.

Mitose

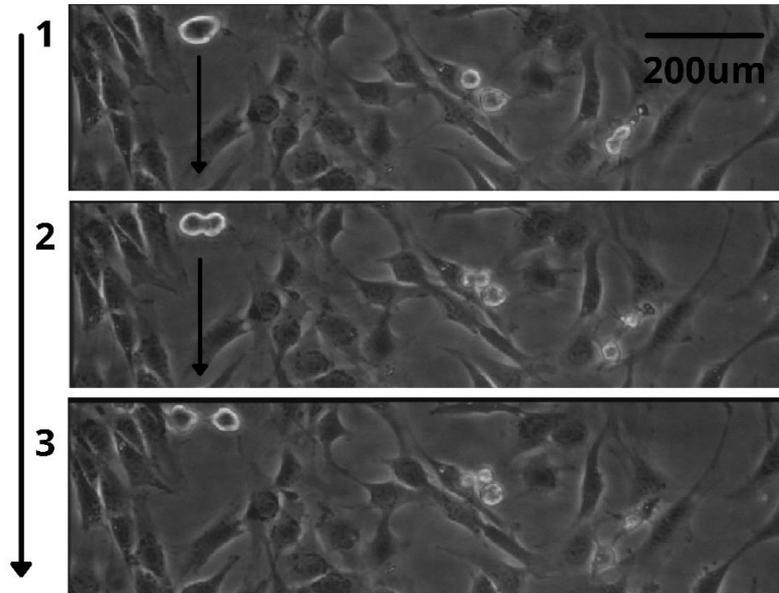


Figura 19 – Imagem representativa de uma célula em mitose. Na placa controle registramos o número de 23 células iniciais e 20 mitoses após 24h, e na placa em contato com os campos magnéticos estáticos registramos o número de 68 células iniciais e de 106 mitoses após 24h

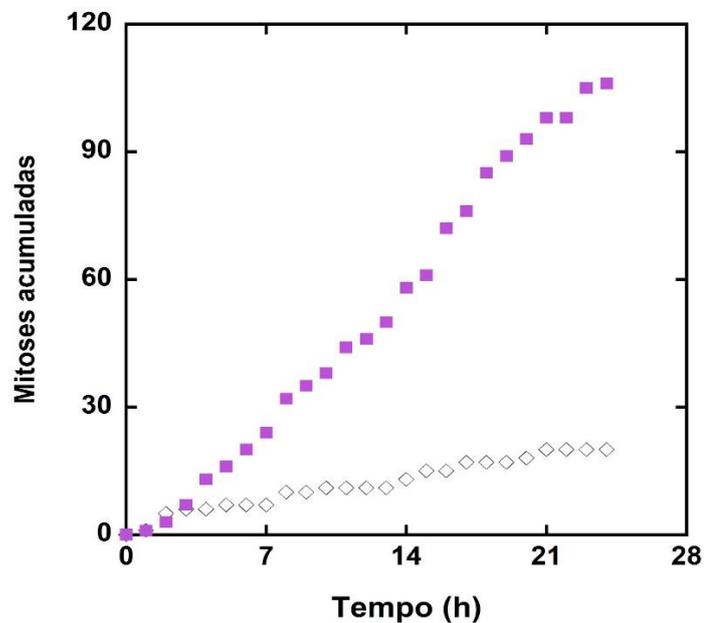


Figura 20 – Número de mitoses ao longo de 24h, nos experimentos controle (losangos brancos) e Porta Amostras → (quadrados roxos), não normalizado.

Nas imagens de 0h e de 24h obtidas nos experimentos de videomicroscopia (Figura 21), podemos observar que após 24h a placa em contato com os campos

magnéticos estáticos, no Porta Amostras \rightarrow , aparece com um maior número de células quando comparamos com a placa controle. Entretanto, os números de células iniciais também são diferentes. O que nos levou a normalizar a taxa de proliferação de cada condição experimental sempre pelo número inicial de células.

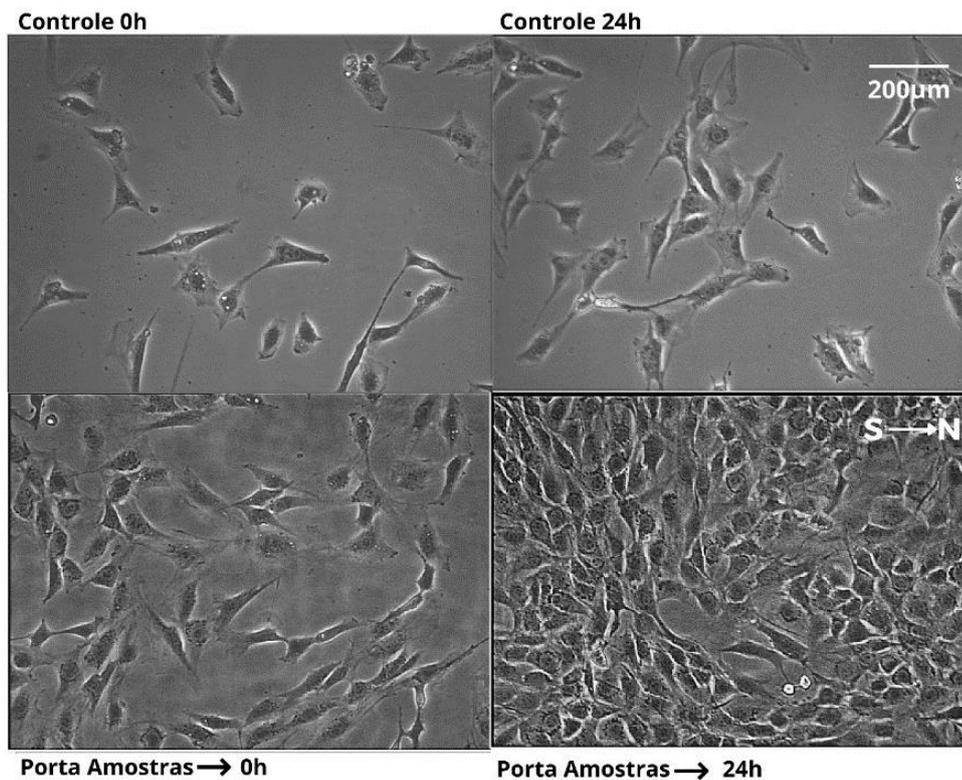


Figura 21 – Imagens representativas dos momentos 0h e 24h do experimento de videomicroscopia nas condições controle e Porta Amostras \rightarrow .

Na Figura 22 apresentamos o resultado do número de mitoses normalizado pelo número de células inicial para cada condição experimental. Observamos que na presença de campo magnético a proliferação celular é significativamente aumentada, quando comparada à situação controle (sem campo).

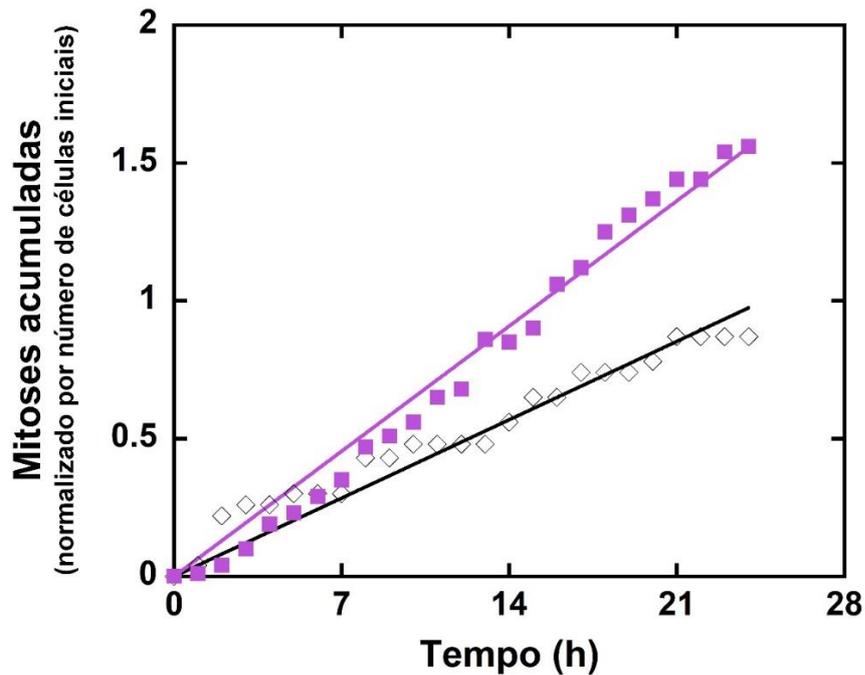


Figura 22 – Mitoses acumuladas hora a hora em 24h nas condições controle (losangos brancos e curva preta) e Porta Amostras \rightarrow (quadrados roxos e curva roxa), normalizados pelos respectivos números de células iniciais em 0h.

Levando em consideração os experimentos realizados, encontramos ajustando os resultados ao modelo proposto na Equação 5:

$$r_{\text{Controle}} = (0,046 \pm 0,001) \text{ mitoses por hora por célula,} \quad (6)$$

$$r_{\text{Porta Amostras } \rightarrow} = (0,065 \pm 0,001) \text{ mitoses por hora por célula,} \quad (7)$$

Consideramos como barra de erro os intervalos de confiança determinados pelo procedimento de ajuste linear.

Para facilitar a discussão, definimos a taxa de mitoses por 100 células, $R = 100 r$, assim:

$$R_{\text{Controle}} = (4,6 \pm 0,1) \text{ mitoses por hora por 100 células,} \quad (8)$$

$$R_{\text{Porta Amostras } \rightarrow} = (6,5 \pm 0,1) \text{ mitoses por hora por 100 células.} \quad (9)$$

Observamos que a taxa de mitose por 100 células, na condição Porta Amostras \rightarrow aumenta em aproximadamente 1.41 vezes em relação à condição controle. Vale ressaltar que esse modelo foi possível de ser usado porque os comportamentos proliferativos foram lineares em ambas as condições experimentais.

4.3 Células NIH3T3 não modificam velocidade de migração na presença de campo magnético.

Além de quantificar a proliferação, também nos perguntamos se existiriam diferenças na motilidade celular das duas condições experimentais descritas anteriormente (controle e Porta Amostras \rightarrow). Para tanto, diferentes células das duas condições experimentais foram acompanhadas de hora em hora e sua posição marcada. Em seguida, foi medida a distância total percorrida pela célula num intervalo de tempo Δt , bem como a distância percorrida pela célula ao longo de sua trajetória, no mesmo intervalo de tempo. Com a primeira medida definimos a velocidade média (V_m) e com a segunda medida a velocidade tangencial (V_t). Pelo menos 30 diferentes células foram caracterizadas para cada condição ao longo das 24h de cultivo no microscópio (Figuras 23 e 24).

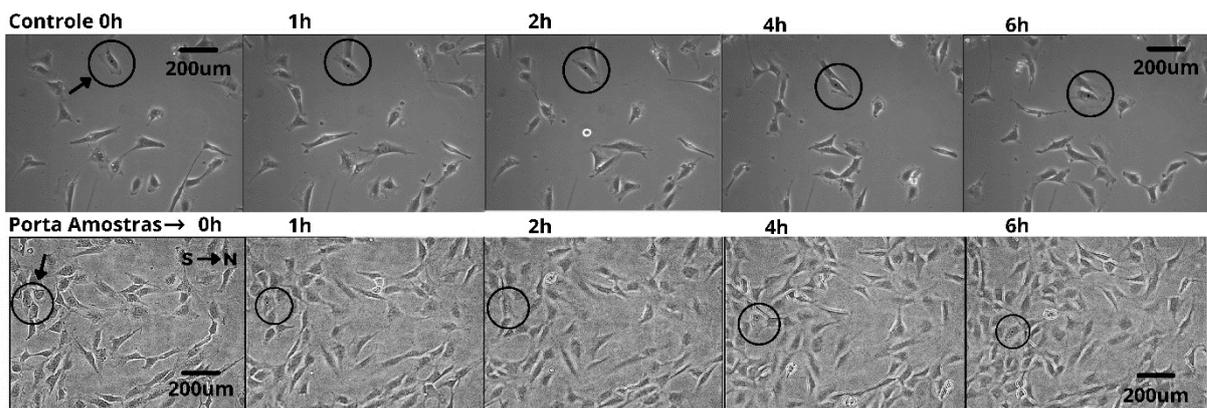


Figura 23 – Marcação da posição da célula por hora para as condições controle e Porta Amostras \rightarrow de duas células nos tempos 0h, 1h, 2h, 4h e 6h.

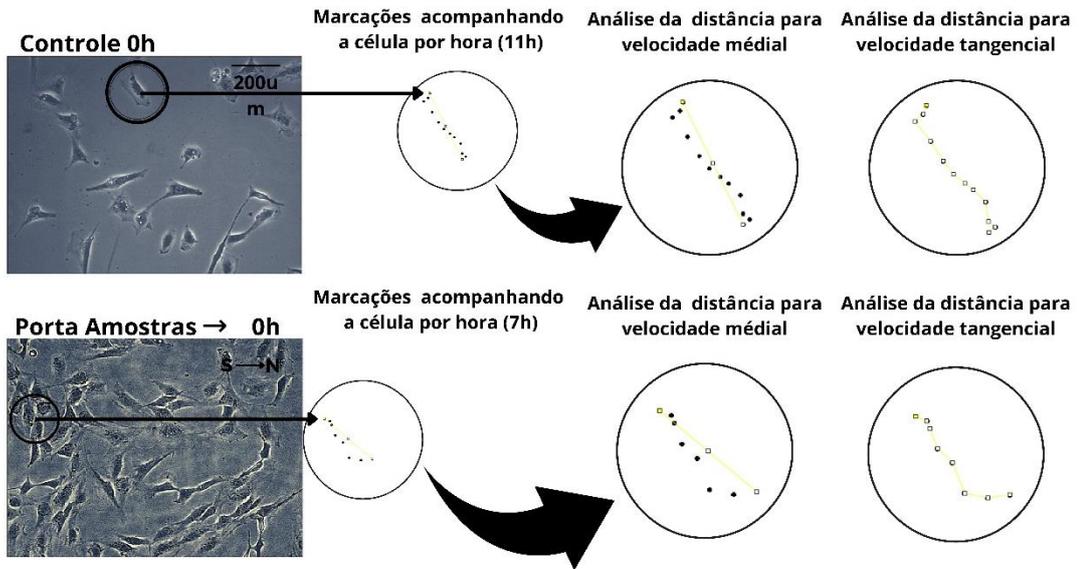


Figura 24 – Representação esquemática da análise das distâncias para determinação das velocidades tangencial e média para as condições controle e Porta Amostras →.

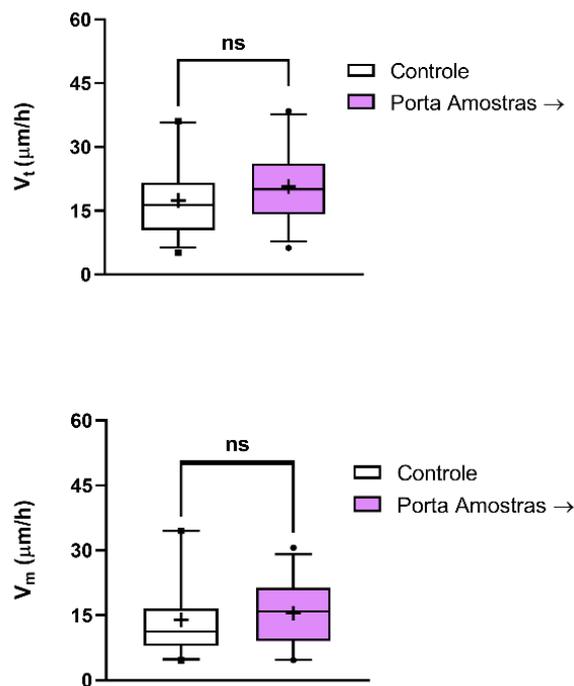


Figura 25 – Velocidades tangencial e média nas condições controle e Porta Amostras →. As caixas retangulares brancas e roxas estendem-se do 25^o ao 75^o percentis, com uma linha horizontal preta representando a mediana e uma cruz preta a média; barras verticais pretas estendem-se do 5^o ao 95^o percentis e os valores fora dessas faixas

são plotados como pontos individuais. ns significa não haver diferença significativa entre os grupos usando o teste t de Student.

Os resultados (Figura 25) indicam que não houve variações significativas entre as velocidades tangenciais e médias das condições controle e Porta Amostras \rightarrow .

4.4 Células NIH3T3 não modificam a direção de migração celular na presença de campo magnético.

Em seguida nos perguntamos se haveria alguma direcionalidade preferencial na migração das células em cada uma das condições experimentais. Direcionalidade essa que poderia estar relacionada com o campo magnético do Porta Amostras \rightarrow . Para isso, realizamos uma análise dos ângulos (θ) da migração celular no experimento de videomicroscopia. Marcamos a posição inicial e final da célula em relação ao tempo em horas e registramos através do ImageJ o ângulo referente à direção e sentido de migração da célula. Detalhes de como a medida foi feita estão representados na Figura 26. Além disso, a fim de podermos obter uma média mais representativa, normalizamos os quadrantes negativos subtraindo os valores negativos encontrados de 180°.

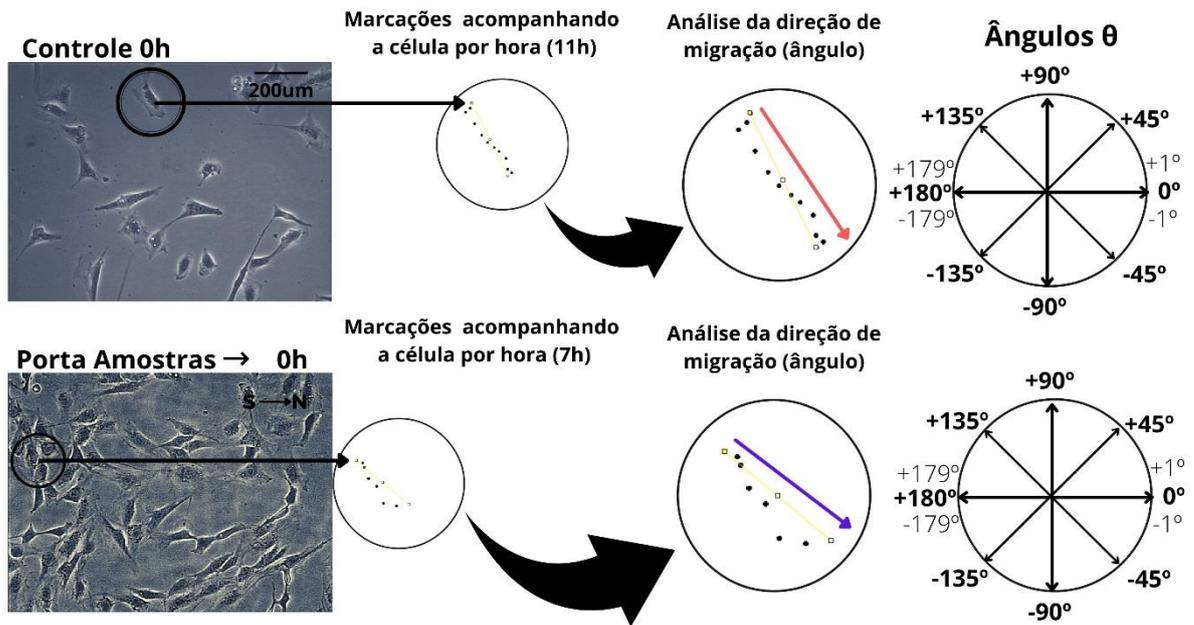


Figura 26 – Representação da análise das direções na migração celular nas condições controle e Porta Amostras \rightarrow em videomicroscopia.

Não foi observada diferença significativa entre a condição controle e a condição Porta Amostras \rightarrow . O θ médio obtido para a condição controle foi de $82 \pm 9^\circ$ e para a condição Porta Amostras \rightarrow foi de $84 \pm 9^\circ$. Sugerindo que o campo magnético na Porta Amostras \rightarrow com polo sul à esquerda e polo norte à direita não influencia no sentido da migração das células (Figura 27).

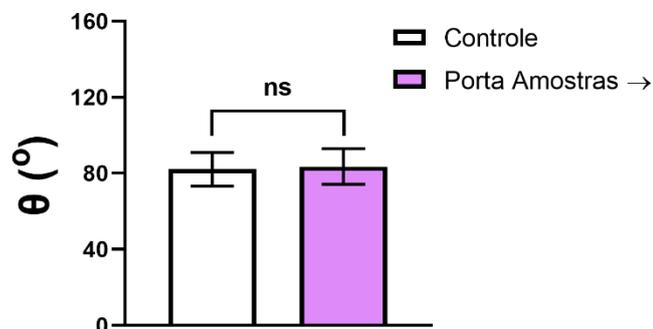


Figura 27 – Gráfico da média dos ângulos θ encontrados nas condições controle e Porta Amostras \rightarrow . Os resultados estão expressos no gráfico como média \pm erro padrão de pelo menos 30 diferentes células para cada condição experimental. ns

significa não haver diferença significativa entre os grupos usando o teste t de Student.

Calculando o parâmetro de ordem, $S = 1/2(3 \cos^2(\theta) - 1)$, e fazendo a média, temos os seguintes valores: $S_{controle} = (0.17 \pm 0.09)$ e $S_{Porta Amostras} = (0.30 \pm 0.09)$. Sendo $S = 1$, totalmente alinhado com o campo e $S = 0$, sem qualquer alinhamento com o campo. Com estes resultados obtemos que a diferença não é significativa, ainda que pareça existir alguma influência relacionada aos campos magnéticos estáticos e aos polos norte e sul.

4.5 “Fechamento de ferida” em monocamadas de células NIH3T3 não é modificado por campo magnético.

Além dos experimentos de quantificação da motilidade em células isoladas em cultura, nos perguntamos também se existiriam efeitos de campos magnéticos estáticos na migração coletiva para fechamento de ferida de monocamadas de células NIH3T3. Para tanto, realizamos 2 procedimentos experimentais distintos, conforme descrito na seção de materiais e métodos. Seguem abaixo as descrições dos resultados obtidos em cada situação experimental.

4.5.1 Experimentos de “fechamento de ferida” com risco manual

Foram realizados experimentos de “fechamento de ferida” nas duas condições experimentais Controle e Porta Amostras \rightarrow , usando culturas de fibroblastos NIH3T3, realizando o risco de formas perpendicular (conforme exemplo da Figura 28) e paralela ao campo magnético na placa de cultura. Na Figura 29 a imagem demonstra a delimitação da área medida.

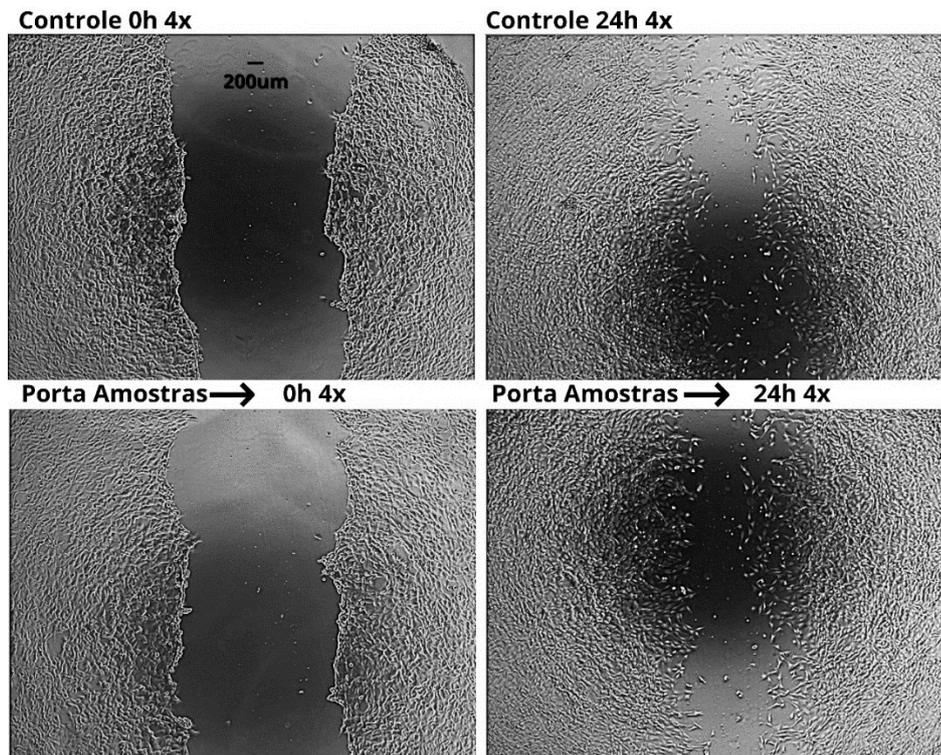


Figura 28 – Fotos representativas dos ensaios de “fechamento de ferida” nas condições controle e Porta Amostras → nos tempos 0h e 24h.

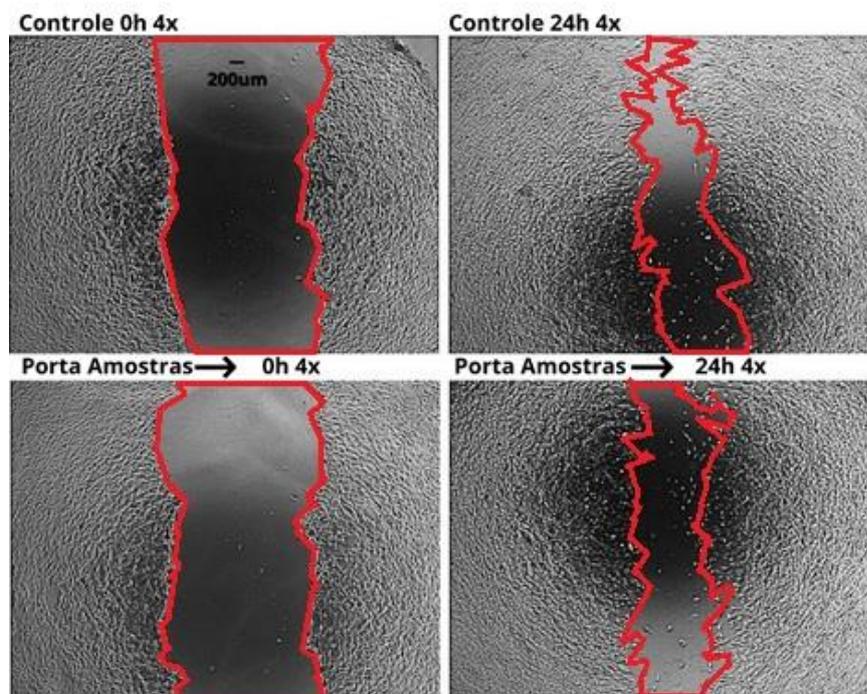


Figura 29 – Fotos representativas da delimitação da área medida nos ensaios de “fechamento de ferida” nas condições controle e Porta Amostras → nos tempos 0h e 24h.

Imagens de diferentes campos foram obtidas ao longo de toda a extensão do risco. Medidas das áreas foram feitas para cada imagem nos tempos 0h (quando foi feita a “ferida” na camada de células) e após 24h. Foram avaliadas as diferenças de áreas sem células e comparadas com o instante 0h usando a seguinte razão σ :

$$\sigma = (A_{0h} - A_{24h})/A_{0h} \quad (10)$$

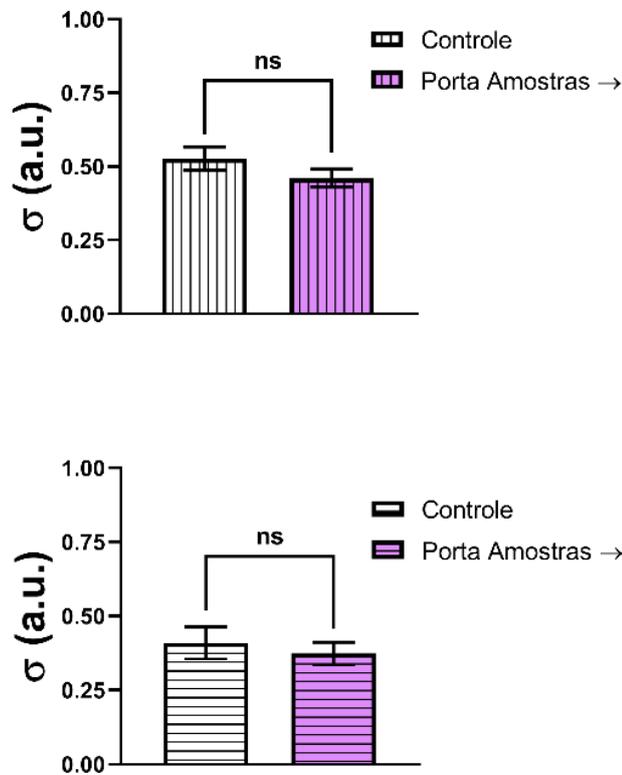


Figura 30 - Razão σ entre as áreas das feridas nas condições Porta Amostras \rightarrow e controle para riscos realizados nas direções perpendicular e paralela ao campo magnético. Os resultados estão expressos nos gráficos como média \pm erro padrão de pelo menos 3 diferentes medidas experimentais. “ns” significa não haver diferença significativa entre os grupos usando o teste t de Student.

Os resultados expressam as razões σ para as condições Porta Amostras \rightarrow e controle (Figura 30), indicando não existir diferença significativa entre as duas condições testadas.

4.5.2 Experimentos de “fechamento de ferida” com uso do quadrado

Em seguida procuramos verificar se os resultados encontrados anteriormente estariam relacionados à grande variabilidade do risco ao longo de toda a sua extensão, já que o mesmo era feito à mão, com o auxílio de uma ponteira de pipeta, conforme descrito em materiais e métodos. Além disso, como o comprimento do risco era maior que o do imã, efeitos mais próximos da borda da placa poderiam ser diferentes de efeitos mais para o centro da placa, o que talvez estivesse contribuindo para mascarar ou intensificar uma possível diferença. Logo, resolvemos estabelecer um segundo esquema experimental em que usamos um quadrado pequeno para simular o “fechamento de ferida”, sem a necessidade de fazer o risco manualmente, buscando assim um risco mais uniforme, além de ser bem menor e, com isso, não introduzir possíveis diferenças entre bordas e centro da placa.

Foram realizados experimentos com células de fibroblastos nas condições controle e Porta Amostras \rightarrow , sendo nesta segunda condição de duas formas: com o risco paralelo e com o risco perpendicular ao campo magnético, como pode ser observado na Figura 31.

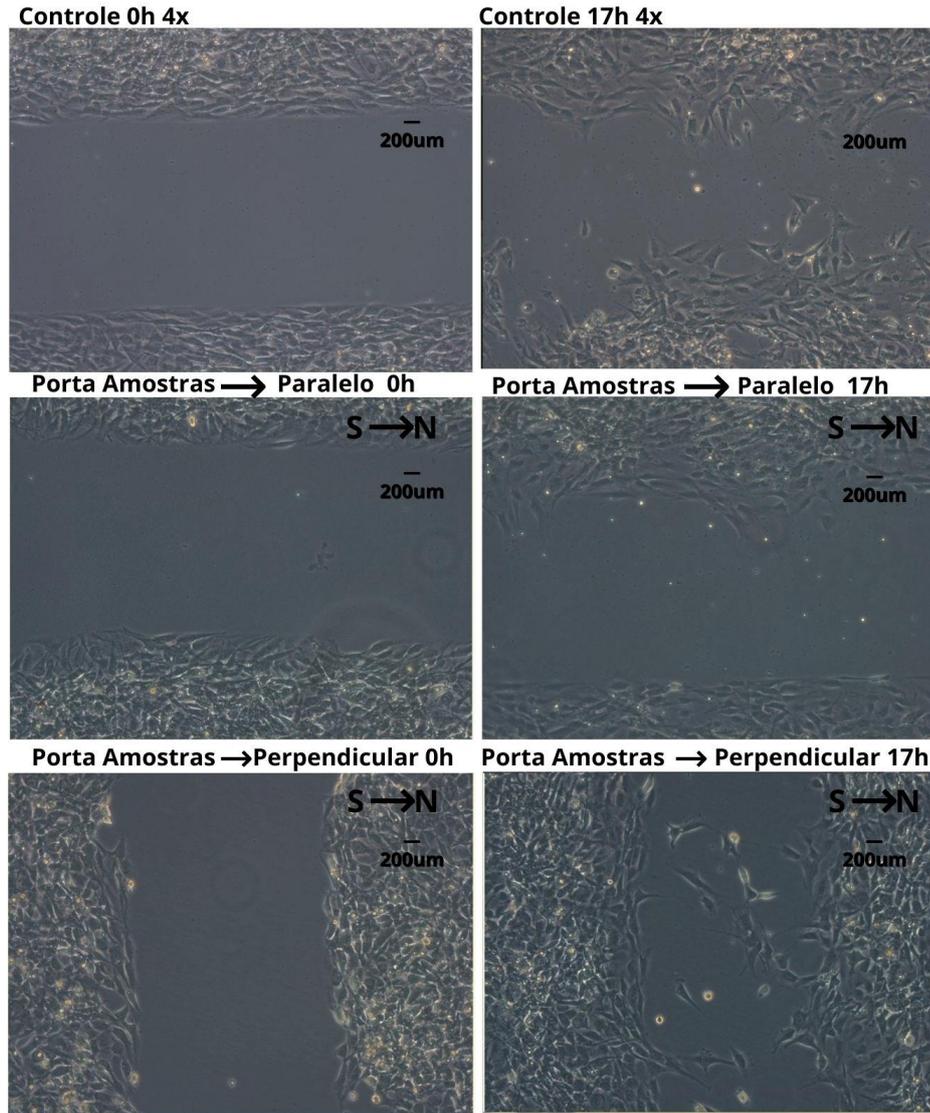


Figura 31 – Fotos representativas dos ensaios de “fechamento de ferida” com o quadrado nas condições controle, Porta Amostras \rightarrow paralelo e Porta Amostras \rightarrow perpendicular nos tempos 0h e 17h.

Imagens de diferentes campos foram obtidas ao longo de toda a extensão dos riscos do quadrado. Medidas das áreas foram feitas para cada imagem nos tempos 0h (quando foi feita a “ferida” na camada de células) e após 17h. Foram avaliadas as diferenças de áreas sem células e comparadas com o instante 0h usando novamente a razão σ , porém agora ajustada para 17h.

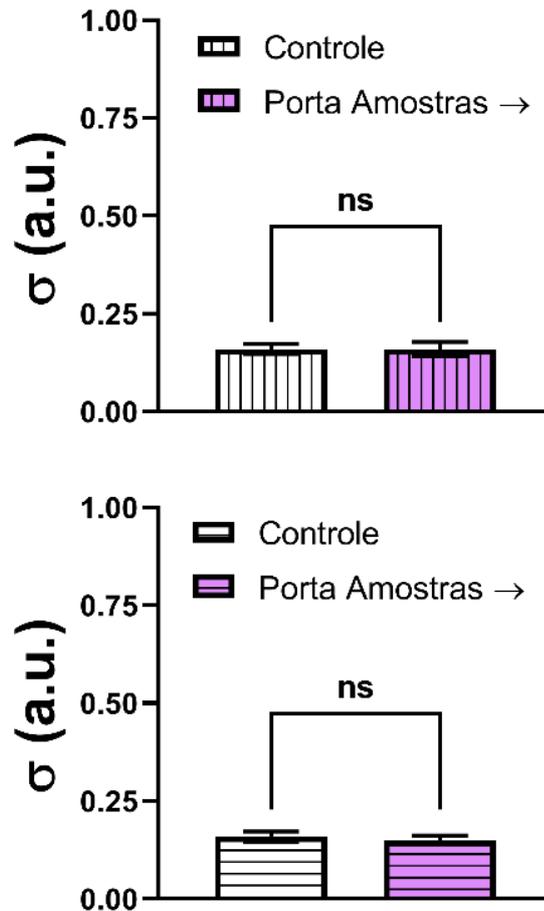


Figura 32 - Razão σ entre as áreas das feridas nas condições Porta Amostras \rightarrow e controle para riscos realizados nas direções perpendicular e paralela ao campo magnético. Os resultados estão expressos nos gráficos como médias \pm erro padrão de pelo menos 3 diferentes medidas experimentais. “ns” significa não haver diferença significativa entre os grupos usando o teste t de Student.

Os resultados expressam as razões σ para as condições Porta Amostras \rightarrow e controle (Figura 32) e confirmam não haver qualquer modificação da motilidade celular para “fechamento da ferida”.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho observamos experimentalmente os efeitos da exposição de campos magnéticos estáticos externos sobre células de fibroblastos 3T3 em cultura, avaliando os efeitos da exposição a diversos sentidos, direções e magnitudes.

Na condição Porta Amostras \rightarrow , com dois ímãs de neodímio colocados nas laterais e em extremidades opostas da placa onde as células estão cultivadas, com o campo direcionado de forma horizontal à monocamada de células e sentido da esquerda para a direita, do polo sul para o polo norte, e de magnitude de $(36,6 \pm 0,2)$ mT no centro da placa, após exposição de 24h encontramos um aumento de proliferação celular estatisticamente significativo, um crescimento linear e uma taxa de crescimento maior (de 1.4 vezes) quando comparada ao controle. Entretanto não foram encontradas mudanças no perfil de migração ou influência no direcionamento celular.

No trabalho de McDonald (McDonald, 1993), foi observada a proliferação de fibroblastos extraídos da calvária de ratos (em nossos experimentos utilizamos células de fibroblastos, porém do tipo 3T3) após exposição a campos magnéticos estáticos de 0,45 T (ou 450 mT) utilizando ímãs localizados a 0,5 cm de distância, que mostraram uma maior captação de timidina e prolina, essas últimas poderiam estar envolvidas no processo de proliferação celular. Neste caso os ímãs estavam localizados abaixo e acima da placa de cultura (McDonald, 1993). Entretanto, em nossos experimentos, utilizando ímãs em posição semelhante, não encontramos aumento de proliferação celular, ainda que no trabalho de McDonald a magnitude aplicada fosse ligeiramente maior.

Ademais, nossos resultados mostram que nas condições onde o ímã de neodímio foi colocado abaixo da placa com a direção do campo magnético de forma vertical à monocamada celular, em experimentos com magnitudes e direções e sentidos diferentes, o crescimento é linear. Mas não encontramos aumento de proliferação celular ou de migração e nenhuma influência no direcionamento celular, quando comparados ao controle. Estas condições foram: na direção Polo Norte \uparrow , com a face do polo norte do ímã encostando no fundo da placa de cultura, de magnitude de (325 ± 3) mT; na direção Polo Sul \downarrow , com a face do polo norte do ímã encostando no fundo da placa de cultura, de magnitude de (396 ± 4) mT (Figura 2); e

na direção Polo Norte_(maior) \uparrow , com um ímã maior de neodímio em formato de disco, que abrangia toda a placa, com a face do polo norte do ímã encostando no fundo da placa de cultura, de magnitude de (280 ± 1) mT.

Nos experimentos de fechamento de “ferida” com o uso do quadrado, não foram encontradas modificações significativas após a exposição aos campos magnéticos. Vale ressaltar que estes experimentos foram realizados apenas nas condições controle e Porta Amostras \rightarrow .

Em um trabalho correlato, Ebrahimdamavandi e Mobasheri também avaliaram o efeito de campos magnéticos estáticos em um modelo de “ferida” com fibroblastos NIH3T3 (Ebrahimdamavandi e Mobasheri, 2019). Os autores buscaram observar os efeitos em cicatrização de feridas, de forma semelhante aos que foram realizados nesta dissertação. Os autores avaliaram os efeitos de campos magnéticos estáticos de magnitudes 10, 50, 80 e 100 mT, após exposição por 18h a 30h (e nesta dissertação o tempo de exposição foi de 17h para o experimento de “ferida”), avaliando a orientação celular e a migração (incluindo a velocidade, a direção, e taxa de crescimento) (Ebrahimdamavandi e Mobasheri, 2019). Os resultados encontrados mostram um efeito na migração celular após exposição aos campos magnéticos e sugerem que este efeito estava relacionado com a magnitude do campo. Com 80mT observaram o maior efeito na migração celular, que também foi associado com a tendência de direcionalidade celular. Além destes fatores os autores avaliaram a morfologia da célula e observaram uma modificação após a exposição aos campos, que alongou as células na magnitude 10 mT. Os autores conjecturaram que os campos magnéticos induziam efeitos na estrutura do citoesqueleto e membrana celular. Neste experimento os autores colocaram as células expostas entre dois ímãs de neodímio, entre os polos norte e sul, semelhante à nossa condição Porta Amostras \rightarrow . Por fim, semelhante aos nossos resultados, estes autores também identificaram uma aparente tendência das células em serem afetadas pelos polos norte e sul, porém sem diferença significativa (Ebrahimdamavandi e Mobasheri, 2019). Nossos resultados experimentais possuem uma análise semelhante, de migração celular e de ângulos de direcionamento de migração; porém, não encontramos diferenças significativas com a presença de campos magnéticos estáticos na modificação e direcionamento dos ângulos celulares.

Campos magnéticos podem exercer influência sobre íons, canais iônicos e canais de cálcio, além de eventualmente poderem influenciar a membrana celular, os filamentos de actina e outros constituintes celulares (Rosen, 2003; Ebrahimdavandi e Mobasheri, 2019).

Sobre os mecanismos que envolvem os efeitos de campos magnéticos temos a força magnética, que poderia produzir tanto a translação quanto a rotação das partículas ou moléculas. Outra possibilidade seria a produção de tensões e correntes elétricas em condutores que se movem em relação a um campo magnético (Barnothy, 1964).

Algumas hipóteses levantadas sobre fenômenos que poderiam estar envolvidos nos efeitos biológicos de campos magnéticos estáticos que observamos neste estudo poderiam ser, de acordo com os efeitos físicos de campos magnéticos sobre a matéria: Diamagnetismo anisotrópico da membrana; Diamagnetismo anisotrópico dos microtúbulos; e Paramagnetismo da actina ou Ferromagnetismo da ferritina.

Até agora, duas correntes principais de estudos foram realizadas sobre os efeitos de campos magnéticos em sistemas biológicos microscópicos induzidos pela ação de campos magnéticos estáticos aplicados externamente: uma possível ação paramagnética ou superparamagnética, ou efeitos associados com moléculas ou agregados ferromagnéticos (Wheeler et al., 2016); e uma possível ação em macromoléculas diamagnéticas anisotrópicas alinhadas, tais como as bicamadas lipídicas (Rosen, 2003), proteínas transmembrana e filamentos de citoesqueleto. No entanto, uma estimativa rigorosa sobre a ordem de magnitude possível desses efeitos para campos mais fracos do que 1T indicam que eles parecem ser insignificantes para qualquer modificação relevante (Meister, 2016).

Podemos classificar os campos magnéticos estáticos de acordo com suas intensidades segundo Zang *et al* (2017) da seguinte maneira:

- a) $B < 1mT$, campos magnéticos “fracos”;
- b) $1mT < B < 1T$, campos magnéticos “moderados”;
- c) $B > 1T$, campos magnéticos “intensos”;

As células de fibroblastos NIH3T3 têm proliferação aumentada na presença de campos magnéticos moderados, segundo os nossos resultados. Abaixo, discutiremos sobre cada um desses possíveis modelos acima mencionados.

1) Diamagnetismo anisotrópico da membrana celular (Rosen, 2003):

A introdução de um material diamagnético ou paramagnético com susceptibilidade x_m (adimensional) numa região de volume V contendo campo magnético estático de intensidade B , produz uma variação de energia ΔU dada por (Jackson, 1998):

$$\Delta U = -\frac{1}{2} \left(\frac{x_m}{\mu_0} \right) B^2 V \quad (11)$$

Materiais diamagnéticos possuem $\chi_m < 0$ e materiais paramagnéticos $x_m > 0$. Ordem de grandeza: (Hidrogênio) $10^{-9} < |x_m| < 10^{-4}$ (Bismuto) (Griffiths, 1999).

Se a molécula do material possui uma anisotropia magnética, o material apresenta uma susceptibilidade magnética $\chi_{||}$

na direção do eixo da molécula e x_{\perp} na direção perpendicular ao eixo da mesma. A variação de energia ΔU neste caso é dada por (Scholz e Boroske, 1984):

$$\Delta U = -\frac{1}{2} \left(\frac{x_{\perp}}{\mu_0} \right) B^2 V - \frac{1}{2} \left(\frac{\chi_{||} - x_{\perp}}{\mu_0} \right) B^2 V \cos^2 \theta, \quad (12)$$

$$\Delta U = -\frac{1}{2} \left(\frac{x_{\perp}}{\mu_0} \right) B^2 V - \frac{1}{2} \left(\frac{x_a}{\mu_0} \right) B^2 V \cos^2 \theta, \quad (13)$$

Com $x_a = \chi_{||} - x_{\perp}$, e θ o ângulo formado entre o campo magnético e o eixo da molécula (no caso de um filamento, o eixo do cilindro que representa a molécula).

Para um material diamagnético anisotrópico com $x_a > 0$, a configuração do material na região de campo magnético com menor energia é aquela em que as moléculas estão com eixos alinhados na direção do campo magnético. Para um material diamagnético anisotrópico com $x_a < 0$, a configuração do material na região de campo magnético com menor energia é aquela em que os eixos das moléculas estão alinhados perpendicularmente à direção do campo magnético.

Os fosfolípidos da membrana celular são materiais diamagnéticos anisotrópicos com $x_a < 0$. Rosen propôs que a membrana é capaz de sofrer deformações com a aplicação de campos magnéticos estáticos moderados. Essas deformações disparariam a abertura de canais de cálcio, que poderiam estar ligados com sinalização celular e culminar na proliferação de células (Rosen, 2003).

Scholz e Boroske mediram a anisotropia na susceptibilidade magnética de lecitinas. Mostraram que vesículas cilíndricas de lecitina se orientam com o eixo do cilindro na direção do campo magnético aplicado. As moléculas orientadas perpendicularmente ao campo, ou seja, com $x_a < 0$ (Scholz e Boroske, 1984).

A ordem de grandeza da energia envolvida, considerando que a região da membrana é um paralelepípedo de área A e espessura b , pode ser estimada em:

$$\frac{\Delta U_{membrana}}{A} \sim \frac{1}{2} \left(\frac{bx_a^{membrana}}{\mu_0} \right) B^2 \quad (14)$$

Usando a intensidade de campo magnético nos experimentos realizados, $B = 36mT$, que $\mu_0 = 1,257 \times 10^{-6} N / A^2$, e o valor médio medido por Scholz e Boroske, para $x_a^{membrana} b = -0.4 \times 10^{-16} m$, encontramos:

$$\frac{\Delta U_{membrana}}{A} \sim 2 \times 10^{-14} N / m \quad (15)$$

Para se ter uma ideia, a energia por unidade de área de uma membrana celular é dada pela tensão superficial da mesma. A tensão superficial da membrana de fibroblastos NIH3T3 é $1.3 \times 10^{-5} N/m$, o que indica que o efeito do campo magnético utilizado nos experimentos realizados é desprezível em comparação com a tensão superficial da membrana celular, no que diz respeito à anisotropia diamagnética das moléculas da membrana (Pontes *et al*, 2011).

Os resultados dos experimentos indicam que o efeito de proliferação aparece para a situação em que as moléculas da membrana celular estão alinhadas perpendicularmente ao campo magnético e não há efeito quando as moléculas estão alinhadas com o campo. Mesmo que o efeito da anisotropia diamagnética das moléculas da membrana fosse apreciável, ele não poderia explicar os resultados obtidos.

2) Diamagnetismo anisotrópico da tubulina (Hernando *et al*, 2020):

Como os fosfolipídios, o dímero de tubulina também apresenta Diamagnetismo anisotrópico, mas com $x_a > 0$. Isso significa que os dímeros de tubulina se orientam na direção do campo aplicado. Os resultados obtidos novamente não podem ser explicados por esse efeito. Isso porque, como os microtúbulos estão em média

alinhados com a superfície da célula, espera-se que campos perpendiculares à superfície da célula produzam maior efeito que campos paralelos. O que não é observado nos experimentos realizados.

Efeito similar acontece com os filamentos de actina, que se orientam na direção do campo magnético aplicado (Torbert, 1984).

3) Ferromagnetismo da ferritina (Wheeler *et al*, 2016).

Este efeito foi considerado muito pequeno em trabalho anterior (Meister, 2016).

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Realizamos experimentos em estufa para avaliar o efeito de campos magnéticos sobre células de fibroblastos NIH3T3. Para obter uma uniformidade temporal e uma uniformidade espacial, registramos oito fotos de campos diferentes de cada condição nos períodos de 0h e 24h. E então medimos as taxas de crescimento do controle e das condições expostas a campos magnéticos estáticos.

Concluimos que os resultados de proliferação de células NIH3T3 indicam aumento de proliferação na condição Porta Amostras \rightarrow , mas não apresenta diferenças significativas nas outras condições experimentais usadas. Os resultados obtidos nestes experimentos nos levam a conclusão de que campos magnéticos estáticos horizontais de ímãs de neodímio (Porta Amostras \rightarrow) aumentam em aproximadamente 53% ($r/r_c = 1.53 \pm 0.16$), a proliferação celular de fibroblastos NIH3T3 após 24h de exposição quando exposto a campos magnéticos moderados.

Nos experimentos de videomicroscopia observamos um aumento de 1.41 vezes na taxa de mitose de células fibroblastos NIH3T3 nas condições de exposição a campos magnéticos estáticos Porta Amostras \rightarrow , quando comparados a condição controle, na ausência de campos magnéticos. Ademais, encontramos, com os resultados dos experimentos nos microscópios, uma proliferação celular que cresce linearmente com o tempo de cultura, em 24h.

Nos experimentos de migração celular concluimos que as células não modificam velocidade de migração na presença de campo magnético. Sobre o direcionamento celular concluimos que não foi observada diferença significativa entre a condição controle e a condição Porta Amostras \rightarrow . Entretanto, parece que existe alguma influência associada no alinhamento do deslocamento de células com o campo magnético aplicado, apesar de mais experimentos e análises serem ainda necessárias.

Para os experimentos de “fechamento de ferida” observamos que em monocamadas de células NIH3T3, quando simulada uma ferida nessa monocamada, através de um risco manual e com o uso de um quadrado, o fechamento da área não apresentou diferenças significativas de modificação por campo magnético.

Não existem muitos artigos na literatura que estudam os efeitos de campos magnéticos estáticos em fibroblastos. Pretendemos avaliar futuramente os efeitos

biológicos da exposição a campos magnéticos estáticos com outras magnitudes, sentidos e direções de campo, avaliar também a morfologia e estrutura celular nestas condições e avaliar os efeitos em condições de adição de nanocristais de magnetita nas culturas de células, além de estudos em outros tipos celulares.

Os mecanismos de ação envolvidos ainda não foram plenamente estabelecidos na literatura. A ligação com canais de cálcio, via deformações do citoesqueleto poderia ser feita por outras moléculas anisotrópicas, cujos eixos de simetria se encontram no plano da célula. Uma outra possibilidade seriam os filamentos intermediários celulares.

Neste trabalho identificamos efeitos significativos da exposição de campos magnéticos nas condições experimentadas apenas na proliferação e taxa de mitose celular em fibroblastos 3T3. Na literatura as pesquisas no tema apresentam resultados distintos que indicam que tais efeitos observados são relacionados ao tipo celular, tempo de exposição ao campo e diversas características do campo aplicado (magnitude, direção, sentido).

O estudo sobre os efeitos biológicos dos campos magnéticos estáticos pode auxiliar a elucidar os mecanismos biológicos e físicos envolvidos e pode promover uma maior compreensão sobre os fenômenos da magnetobiologia, que estuda os efeitos da exposição de campos magnéticos externos sobre organismos vivos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. P. *et al.* Swimming behaviour of the multicellular magnetotactic prokaryote “*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*” under applied magnetic fields and ultraviolet light. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 845–857, 2013.
- ARAÚJO, D. B. de. *et al.* Biomagnetismo: Nova interface entre a física e a biologia. **Revista Ciência Hoje**, v. 26, n. 153, p. 25-33, 1999.
- BAGNOLI, F.; LIVI, R. Michael Faraday: a virtuous life dedicated to science. **Michael Faraday: a virtuous life dedicated to science**, v. 2, n. 1, p. 121–134, 2018.
- BANSAL, H. L. Magnetotherapy: Self-help book. New Delhi, India: **Ed. B. Jain Publishers (P) LTDA**, 1989.
- BARNÓTHY, M. F. Biological Effects of Magnetic Fields. New York: **Springer Science+Business Media**, 1964.
- BARNÓTHY, M. F. Biological Effects of Magnetic Fields: Volume 2. New York: **Springer Science+Business Media**, 1969.
- BAULE, G.; MCFEE, R. Detection of the magnetic field of the heart. **American Heart Journal**, v. 66, n. 1, p. 95–96, 1963.
- BAZYLINSKI, D. A.; FRANKEL, R. B. Magnetosome formation in prokaryotes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 217–230, 2004.
- BECK-KRUEGER, E. *et al.* Electric and magnetic fields applied to peripheral nerve regeneration. **Revista Neurociências**, v. 19, n. 2, p. 314–328, 2011.
- BELOVA, N. A.; PANCHELYUGA, V. A. Lednev’s model: Theory and experiment. **Biophysics**, v. 55, n. 4, p. 661–674, 2010.
- BINHI, V. N. Amplitude and frequency dissociation spectra of ion-protein complexes rotating in magnetic fields. **Bioelectromagnetics**, v. 21, n. 1, p. 34–45, 2000.
- BUCHACHENKO, A. L. Magnetic field-dependent molecular and chemical processes in biochemistry, genetics and medicine. **Russian Chemical Reviews**, v. 83, n. 1, p. 1–12, 2014.
- CARLSON, J. B. Lodestone Compass: Chinese or Olmec Primacy? Multidisciplinary analysis of an Olmec hematite artifact from San Lorenzo, Veracruz, Mexico. **Science**, v.189, n. 4205, setembro de 1975.

CFBM. **Normativa CFBM nº 01/2012 de 10 de abril de 2012**. Disponível em: <http://www.crbm1.gov.br/normativa_012012.pdf>. Acessado em: 10 de fevereiro de 2022.

CFBM. **Normativa CFBM nº 001/2016, de 28 de janeiro de 2016**. Disponível em: <<https://crbm1.gov.br/site2019/wp-content/uploads/2014/01/NORMATIVA-001.2016-ACUPUNTURA.pdf>>. Acessado em: 10 de fevereiro de 2022.

CFBM. **Resolução do CFBM nº 02/1995 de 25 de março de 1995**. Disponível em: <http://crbm1.gov.br/RESOLUCOES/resolucao_02-03.pdf>. Acessado em: 10 de fevereiro de 2022.

CHANG, S.; KIRSCHVINK, J. L. Sediments , and the Evolution of Magnetite. **Annu. Rev. Earth Planet. Sci**, v. 17, p. 169–95, 1989.

COHEN, D. Detection and analysis of magnetic fields produced by bioelectric currents in humans. **Journal of Applied Physics**, v. 40, n. 3, p. 1046–1048, 1969.

CONSIDINE, G. D. Van Nostrand's Scientific Encyclopedia. **Wiley-Interscience**, 2006.

CYPRIANO, J. *et al.* Uptake and persistence of bacterial magnetite magnetosomes in a mammalian cell line: Implications for medical and biotechnological applications. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1–11, 2019.

CYPRIANO, J. *et al.* Insight on thermal stability of magnetite magnetosomes: implications for the fossil record and biotechnology. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.

DIAS, V. S.; MARTINS, R. DE A. Michael Faraday: o caminho da livraria à descoberta da indução eletromagnética. **Ciência & Educação (Bauru)**, v. 10, n. 3, p. 517–530, 2004.

DICARLO, A. L.; FARRELL, J. M.; LITOVITZ, T. A. A Simple Experiment to Study Electromagnetic Field Effects: Protection Induced by Short-term Exposures to 60 Hz Magnetic Fields. **Bioelectromagnetics**, v. 19, n. 8, p. 498–500, 1998.

DING, H. MIN *et al.* Hypomagnetic fields cause anxiety in adult male mice. **Bioelectromagnetics**, v. 40, n. 1, p. 27–32, 2019.

EGUCHI, Y. *et al.* Effectiveness of magnetically aligned collagen for neural regeneration in vitro and in vivo. **Bioelectromagnetics**, v. 36, n. 3, p. 233–243, 2015.

ESCOBAR, J. F. *et al.* In Vitro Evaluation of the Effect of Stimulation with Magnetic Fields on Chondrocytes. **Bioelectromagnetics**, v. 41, n. 1, p. 41–51, 2020.

FALCONIERI, A.; VINCENTIIS, S. DE; RAFFA, V. Recent advances in the use of

- magnetic nanoparticles to promote neuroregeneration. **Nanomedicine**, v. 14, n. 9, p. 1073–1076, 2019.
- FARADAY, M. MARTIN, T. (Ed.). Faraday's diary: being the various philosophical notes of experimental investigation made by Michael Faraday, D. C. L., F. R. S., 1820-1862. London: **Ed. HR Direct**. 1932-1936, 2008.
- FERRY, D. The Epistles of Horace: Bilingual Edition. **Ed. Farrar, Straus e Giroux**, 2002.
- FOLETTI, A. *et al.* Bioelectromagnetic medicine: The role of resonance signaling. **Electromagnetic Biology and Medicine**, v. 32, n. 4, p. 484–499, 2013.
- G., R. T.; Oersted—the Discoverer of Electro-magnetism. **Nature**, v.107, p.492–495, 1921.
- GILBERT, W. De magnete. **Londres: Peter Short**, 1600.
- GMITROV, J. Static Magnetic Field Versus Systemic Calcium Channel Blockade Effect on Microcirculation: Possible Mechanisms and Clinical Implementation. **Bioelectromagnetics**, v. 41, n. 6, p. 447–457, 2020.
- GRASSI-SCHULTHEISS, P. P.; HELLER, F.; DOBSON, J. Analysis of magnetic material in the human heart, spleen and liver. **BioMetals**, v. 10, n. 4, p. 351–355, 1997.
- GRILLONE, A.; CIOFANI, G. Magnetic Nanotransducers in Biomedicine. **Chemistry - A European Journal**, v. 23, n. 64, p. 16109–16114, 2017.
- HAMMOND, J. *et al.* Variation in the concentration and regional distribution of magnetic nanoparticles in human brains, with and without Alzheimer's disease, from the UK. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2021.
- HENRY, J. Contributions to Electricity and Magnetism. **Transactions of the American Philosophical Society**, v.6. p.303-337, 2 de Novembro de 1839.
- HU, G. L. *et al.* ELF magnetic field inhibits gap junctional intercellular communication and induces hyperphosphorylation of connexin43 in NIH3T3 cells. **Bioelectromagnetics**, v. 22, n. 8, p. 568–573, 2001.
- HUANG, H. *et al.* Remote control of ion channels and neurons through magnetic-field heating of nanoparticles. **Nature Nanotechnology**, v. 5, n. 8, p. 602–606, 2010.
- HULOT, G. *et al.* The Magnetic Field of Planet Earth. **Space Science Reviews**, V. 152, n. 1, p. 159-222, 2010.
- KESKIN, Y. *et al.* The effect of magnetic field therapy and electric stimulation on experimental burn healing. **Turkish Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 65, n. 4, p. 352–360, 2019.

- KILINC, D.; DENNIS, C. L.; LEE, G. U. Bio-Nano-Magnetic Materials for Localized Mechanochemical Stimulation of Cell Growth and Death. **Advanced Materials**, v. 28, n. 27, p. 5672–5680, 2016.
- KIM, O. *et al.* Reflectance spectrometry of normal and bruised human skins: experiments and modeling. **Physiological Measurement**, v. 33, n. 2, p. 159-175, 2012.
- KIRSCHVINK, J. L. Ferromagnetic crystals (magnetite?) in human tissue. **Journal of Experimental Biology**, v. 92, p. 333–335, 1981.
- KIRSCHVINK, J. L. Magnetite biomineralization and geomagnetic sensitivity in higher animals: An update and recommendations for future study. **Bioelectromagnetics**, v. 10, n. 3, p. 239–259, 1989.
- KIRSCHVINK, J. L.; KOBAYASHI-KIRSCHVINK, A.; WOODFORD, B. J. Magnetite biomineralization in the human brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 16, p. 7683–7687, 1992.
- KOLESOV, S. *et al.* Developing new methods of spinal cord injury treatment using magnetic nanoparticles in combination with electromagnetic field. **Coluna/ Columna**, v. 16, n. 2, p. 145–148, 2017.
- KOPÁNI, M. *et al.* Iron oxides in human spleen. **BioMetals**, v. 28, n. 5, p. 913–928, 2015.
- LI, C. R. *et al.* Quantifying the color changes in bruised skin using a color-calibrated imaging system. **IEEE International Symposium on Medical Measurements and Applications (MeMeA)**, p. 1-5, 2020.
- LIMA, J. R. T. Magnetoterapia Clínica: Uma alternativa eficaz para tratamentos diversos. Santos, São Paulo: **Editores Comunicar**, 2016.
- LEDNEV, V. V. Possible mechanism for the influence of weak magnetic fields on biological systems. **Bioelectromagnetics**, v. 12, n. 2, p. 71–75, 1991.
- LETUTA, U. G. *et al.* Enzymatic mechanisms of biological magnetic sensitivity. **Bioelectromagnetics**, v. 38, n. 7, p. 511–521, 2017.
- LI, F. *et al.* Pulsed magnetic field accelerate proliferation and migration of cardiac microvascular endothelial cells. **Bioelectromagnetics**, v. 36, n. 1, p. 1–9, 2015.
- MAHER, B. A. *et al.* Magnetite pollution nanoparticles in the human brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 39, p. 10797–10801, 2016.
- MAHER, B. A. *et al.* Airborne Magnetite- and Iron-Rich Pollution Nanoparticles:

- Potential Neurotoxicants and Environmental Risk Factors for Neurodegenerative Disease, Including Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 71, n. 2, p. 361–375, 2019.
- MAKINISTIAN, L. A new class of signals for magnetobiology research. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2019.
- MALMIVUO, J.; PLONSEY, R. Bioeletromagnetism: Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields. New York Oxford: **Oxford University Press**, 1995.
- MARKOV, M. XXIst century magnetotherapy. **Electromagnetic Biology and Medicine**, v. 34, n. 3, p. 190–196, 2015.
- MARTINO, C. F. *et al.* Effects of weak static magnetic fields on endothelial cells. **Bioelectromagnetics**, v. 31, n. 4, p. 296–301, 2010.
- MARTINO, C. F. *et al.* Static magnetic field sensitivity of endothelial cells. **Bioelectromagnetics**, v. 32, n. 6, p. 506–508, 2011.
- MAXWELL, J. C. On Physical Lines of Force. The London, **Edinburgh and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science**, 1861.
- MCDONALD, F. Effect of static magnetic fields on osteoblasts and fibroblasts in vitro. **Bioelectromagnetics**, v. 14, n. 3, p. 187–196, 1993.
- MO, W. CHUAN *et al.* Magnetic Shielding Accelerates the Proliferation of Human Neuroblastoma Cell by Promoting G1-Phase Progression. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2013.
- MUNRO, U. H. *et al.* Magnetite-based magnetoreception in birds: the effect of a biasing field and a pulse on migratory behavior. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, n. 19, p. 3031–3037, 2002.
- MURROS, K. *et al.* Magnetic Nanoparticles in Human Cervical Skin. **Frontiers in Medicine**, v. 6, n. June, p. 1–10, 2019.
- NAGHIBZADEH, MEHRAN *et al.* The effect of electromagnetic field on decreasing and increasing of the growth and proliferation rate of dermal fibroblast cell. **Dermatologic Therapy**, v. 33, n. 4, 2020.
- OERSTED, C. H. Experimenta circa effectum conflictus electrici in acum magneticam. Copenhagen: **Impresso por Schultzianis**, 1820.
- OKANO, H. *et al.* Effects of a moderate-intensity static magnetic field on VEGF-A stimulated endothelial capillary tubule formation in vitro. **Bioelectromagnetics**, v. 27, n. 8, p. 628–640, 2006.
- ONGARO, A. *et al.* Pulsed electromagnetic fields stimulate osteogenic differentiation

in human bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stem cells. **Bioelectromagnetics**, v. 35, n. 6, p. 426–436, 2014.

PAROLA, A. H.; PORAT, N.; KIESOW, L. A. Chicken embryo fibroblasts exposed to weak, time-varying magnetic fields share cell proliferation, adenosine deaminase activity, and membrane characteristics of transformed cells. **Bioelectromagnetics**, v. 14, n. 3, p. 215–228, 1993.

PERCHERANCIER, Y. *et al.* Effects of 50Hz magnetic fields on gap junctional intercellular communication in NIH3T3 cells. **Bioelectromagnetics**, v. 36, n. 4, p. 287–293, 2015.

PESQUEIRA, T.; COSTA-ALMEIDA, R.; GOMES, M. E. Magnetotherapy: The quest for tendon regeneration. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 10, p. 6395–6405, 2018.

PURCELL, E. M. *Electricity e Magnetism*. New York: **McGraw-Hill**, 1985.

RANDEBERG, L. L. *et al.* Skin changes following minor trauma. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 39, n. 5, p. 403-413, 2007.

RATTERMAN, *et al.* Magnet Therapy: What's the Attraction? **Journal of the American Academy of Nurse Practitioners**, v. 14, n. 8, 2002.

ROET, M. *et al.* Progress in neuromodulation of the brain: A role for magnetic nanoparticles? **Progress in Neurobiology**, v. 177, n. April 2018, p. 1–14, 2019.

SCHIMMELPFENG, J.; DERTINGER, H. Action of a 50 Hz Magnetic Field on Proliferation of Cells in Culture. **Bioelectromagnetics**, v. 18, n. 2, p. 177–183, 1997.

SCHULTHEISS-GRASSI, P. P.; WESSIKEN, R.; DOBSON, J. TEM investigations of biogenic magnetite extracted from the human hippocampus. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1426, n. 1, p. 212–216, 1999.

SEGAL, Y. *et al.* The Effect of Electromagnetic Field Treatment on Recovery from Ischemic Stroke in a Rat Stroke Model: Clinical, Imaging, and Pathological Findings. **Stroke Research and Treatment**, v. 2016, 2016.

SEGAL, Y.; SEGAL, L. The Effect of Electromagnetic Field Treatment on Recovery from Spinal Cord Injury in a Rat Model – Clinical and Imaging Findings. **International Journal of Neurorehabilitation**, v. 03, n. 02, 2016.

SENA, C. A. *et al.* Punção de vasos e paleta cromática: subsídio para pesquisa e prática clínica de enfermeiros. **Revista de Enfermagem do Centro Oeste Mineiro**, v. 3, n. 1, 2013.

- SILVÉRIO-LOPES, S. Analgesia por Acupuntura: Capítulo 4. Curitiba, PR: **Ed. Omnipax**, 2013.
- SOUZA, M. M. de. Magnetoterapia - Uma maneira natural para recuperar e manter a saúde. São Paulo: **Editora Nova Ibraqui**, 3ª ed., 2020.
- STERNICKEL, K.; BRAGINSKI, A. I. Biomagnetism using SQUIDs: Status and perspectives. **Superconductor Science and Technology**, v. 19, n. 3, 2006.
- TANG, D. D.; PAI, C. F. Magnetic Memory Technology: Spin-Transfer-Torque MRAM and Beyond. Hoboken: **Wiley-IEEE Press**, 2021.
- TAY, A. *et al.* Induction of Calcium Influx in Cortical Neural Networks by Nanomagnetic Forces. **ACS Nano**, v. 10, n. 2, p. 2331–2341, 2016.
- TIPLER, P. A.; MOSCA, G. Física para cientistas e engenheiros: eletricidade e magnetismo, ótica. Rio de Janeiro: **LTC**. 2006.
- TONG, J. *et al.* Pulsed electromagnetic fields promote the proliferation and differentiation of osteoblasts by reinforcing intracellular calcium transients. **Bioelectromagnetics**, v. 38, n. 7, p. 541–549, 2017.
- VALI, H. *et al.* Formation of tabular single-domain magnetite induced by *Geobacter metallireducens* GS-15. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 46, p. 16121–16126, 2004.
- VIDOVIC, L.; MILANIC, M.; MAJARO, B. Objective characterization of bruise evolution using photothermal depth profiling and Monte Carlo modeling. **Journal of Biomedical Optics**, v. 20, n. 1, 2015.
- WANG, C. X. *et al.* Transduction of the Geomagnetic Field as Evidenced from alpha-Band Activity in the Human Brain. **eNeuro**, v. 6, n. 2, 2019.
- WANG, D. *et al.* Cellular ATP levels are affected by moderate and strong static magnetic fields. **Bioelectromagnetics**, v. 39, n. 5, p. 352–360, 2018.
- WANG, X. *et al.* Magnetic Measurement and Stimulation of Cellular and Intracellular Structures. **ACS nano**, v. 14, n. 4, p. 3805–3821, 2020.
- WERCKMANN, J. *et al.* Localized iron accumulation precedes nucleation and growth of magnetite crystals in magnetotactic bacteria. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.
- ZHANG, B. *et al.* Effects and Mechanisms of Exogenous Electromagnetic Field on Bone Cells: A Review. **Bioelectromagnetics**, v. 41, n. 4, p. 263–278, 2020.
- ZHANG, X.; YAREMA, K.; XU, A. Biological Effects of Static Magnetic Fields. Singapore: **Springer Nature**, 2017.