

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA ESTÁTICA EM CULTURA
CELULAR**

HELOUISE RICHARDT MEDEIROS

Porto Alegre

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA ESTÁTICA EM CULTURA
CELULAR**

HELOUISE RICHARDT MEDEIROS

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Iraci Lucena da Silva
Torres

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor em
Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Medeiros, Helouise
EFEITO DA ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA ESTÁTICA EM CULTURA
CELULAR / Helouise Medeiros. -- 2022.
58 f.
Orientador: Iraci Torres.

Coorientador: Elizabeth Cirne-Lima.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2022.

1. Estimulação Magnética Estática. 2.
Neuroblastoma. 3. Viabilidade Celular. I. Torres,
Iraci, orient. II. Cirne-Lima, Elizabeth, coorient.
III. Título.

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

"Não há saber mais ou saber menos, há saberes diferentes."

Paulo Freire

Agradecimentos

Durante esses quatro anos só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Foram momentos incertos, devido a pandemia, onde nos deixaram ansiosos e muitas vezes desacreditados e tive a sorte de ter pessoas como vocês, que nunca me deixaram desistir e sempre acreditaram em mim. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

À minha orientadora **Profª Iraci Lucena da Silva Torres**, fonte de conhecimento e profissionalismo, eu agradeço, por entender as minhas inseguranças e me dar apoio para superar elas. Amadureci como pesquisadora aprendendo muito contigo, admiro teu trabalho e tua pessoa.

Ao **Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação**, que ao se unir ao Lab. da Hepatologia, proporcionou inúmeros momentos de conhecimentos e discussão mas também de descontração e amizade. São pessoas que irei levar para minha vida!

Ao **José Assumpção**, pós-doutorando que me acompanhou por todo processo, me ensinando demais e também ouvindo, acalmando e incentivando a melhorar. Sou extremamente grata por seus ensinamentos, amizade e dedicação. Sempre com uma solução simples para os meus problemas que pareciam ser gigantes. Obrigada!

As amigas que fiz devido aos meus anos no HCPA e que deixaram estes muito mais leves. Como a **Nicole Henckes**, amiga que viveu junto comigo cada etapa e sempre me deu suporte; a **Liciane Medeiros**, que sempre esteve disponível para me auxiliar, acalmar e dar boas risadas; a **Geciéle** e **Bruna** que me dão a base e força para continuar atrás dos meus objetivos, com muito amor e carinho.

Ao meu marido, **Davi Kirsch**, meu ponto de equilíbrio, pela sua incansável boa vontade em me ajudar, compartilhando meus ideais e incentivando-me a prosseguir. Enfim, por estar incessantemente ao meu lado, acreditando em mim. Amo você!

E por último, mas não menos importante, meus pais **Flávia Medeiros** e **Eduardo Medeiros**, e meu irmão e cunhada, **Lucas Medeiros** e **Luiza Reckziegel**, um enorme obrigado por sempre acreditarem em mim e naquilo que faço e por todos os ensinamentos de vida.

Família, espero que esta etapa, que agora termino, possa de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem. Só foi possível concluir este trabalho com todo o suporte que me deram durante o estudo. **Obrigada família, dedico a vocês!**

RESUMO

O câncer é uma das causas mais comuns de morte mundialmente. Os tratamentos disponíveis são associados a numerosos efeitos adversos, aliado à pequena porcentagem de pacientes que atingem a completa remissão, instigando a necessidade de novas estratégias terapêuticas. Tendo isto em vista, a utilização de ímãs estáticos no sistema nervoso central surge como uma técnica de neuromodulação não invasiva que oferece novas possibilidades de tratamento, sendo necessária, porém, uma compreensão completa dos mecanismos de ação subjacentes à resposta celular. O principal objetivo desta tese foi investigar os efeitos da Estimulação Magnética Estática (EME) sobre a viabilidade, morte, ciclo e proliferação celular, e autofagia e quantidade de mitocôndrias. Inicialmente foram testados diferentes tempos de estimulação (6, 12, 24, 36h, 72 horas e 6 dias) com intensidade de 0,3T na linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y em cultura. Para verificar a resposta celular a EME, os parâmetros de viabilidade celular (MTT), morte e ciclo celular (coloração de anexina-V/PI e análise de iodeto de propídio, respectivamente), proliferação celular (CFSE), autofagia (laranja de acridina) e quantidade total mitocondrial (MitoTracker™ Verde) foram analisados. Verificou-se que a exposição a EME 0,3T por 24h e 6 dias, reduziu a viabilidade celular das células SH-SY5Y ($P < 0,05$), sem alterações nas células da linhagem HMVII, utilizadas como comparação para outro tipo tumoral. Nenhuma diferença foi encontrada nos parâmetros de morte celular ou parada do ciclo celular em SH-SY5Y ($P > 0,05$). Adicionalmente, houve redução da autofagia e proliferação celular após 6 dias de exposição e diminuição do número de mitocôndrias em ambos os tempos ($P < 0,05$). Em conclusão, a EME reduziu a viabilidade celular (0,3T/24h e 6 dias), a proliferação, a autofagia (0,3T/6 dias) e o número de mitocôndrias em células SH-SY5Y (0,3T/24h e 6 dias), mostrando ser uma potencial terapia adjuvante no tratamento de tumores neuronais.

Palavras chave: Estimulação Magnética Estática, Câncer, Proliferação, Autofagia, Mitocôndrias

ABSTRACT

Cancer is one of the most common causes of death worldwide. Available treatments are associated with numerous adverse effects, coupled with the small percentage of patients who achieve complete remission, prompting the need for new therapeutic strategies. With this in mind, the use of static magnets in the central nervous system emerges as a non-invasive neuromodulation technique that offers new treatment possibilities, however, a complete understanding of the mechanisms of action underlying the cellular response is necessary. The main objective of this thesis was to investigate the effects of Static Magnetic Stimulation (SMS) on cell viability, death, cell cycle and proliferation, and autophagy and number of mitochondria. Initially, different stimulation times were tested (6, 12, 24, 36h, 72 hours and 6 days) with an intensity of 0.3T in the SH-SY5Y neuroblastoma lineage in culture. To verify the cellular response to SMS, the parameters of cell viability (MTT), cell death and cell cycle (annexin-V/PI staining and propidium iodide analysis, respectively), cell proliferation (CFSE), autophagy (acridine orange) and total mitochondrial amount (MitoTracker™ Green) were analyzed. It was found that exposure to SMS 0.3T for 24h and 6 days reduced the cell viability of SH-SY5Y cells ($P < 0.05$), with no changes in cells of the HMVII lineage, used as a comparison for another tumor type. No difference was found in cell death or cell cycle arrest parameters in SH-SY5Y ($P > 0.05$). Additionally, there was a reduction in autophagy and cell proliferation after 6 days of exposure and a decrease in the number of mitochondria at both times ($P < 0.05$). In conclusion, SMS reduced cell viability (0.3T/24h and 6 days), proliferation and autophagy (0.3T/6 days) and the number of mitochondria in SH-SY5Y cells (0.3T/24h and 6 days), showing to be a potential adjuvant therapy in the treatment of neuronal tumors.

Key-words: Static Magnetic Stimulation, Cancer, Proliferation, Autophagy, Mitochondria

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferenças entre TMS, tDCS, SMS. Retirada do artigo Viudes-Sarrion et al 2021.....	12
Figura 2 - Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	16
Figura 3 - Marco conceitual exemplificando o Artigo 1.....	17
Figura 4 - Marco conceitual exemplificando o Artigo 2.....	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil éster
EME	Estimulação Magnética Estática
EMEt	Estimulação Magnética Estática transcraniana
EMT	Estimulação Magnética Transcraniana
ETCC	Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua
HMV II	<i>Human Vaginal Malignant Melanoma</i>
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolina)
NIBS	Estimulação Cerebral Não Invasiva
PI	Iodeto de Propídeo
SH-SY5Y	Neuroblastoma
TTFields	<i>Tumor Treating Fields</i>

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS	8
1. APRESENTAÇÃO	10
2. INTRODUÇÃO	11
1.1 Efeitos da EME (Estimulação Magnética Estática) sobre modelos de cultura de células	
12	
1.2 Propriedades Tumerais do Câncer	13
1.3 Epidemiologia do Câncer de Sistema Nervoso	14
1.4 Efeitos da EME sobre modelos tumorais	15
3. REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações	16
4. MARCO CONCEITUAL	17
5. JUSTIFICATIVA	19
6. OBJETIVOS	20
6.1 Objetivo primário	20
6.2 Objetivos Artigo 1	20
6.3 Objetivos Artigo 2	20
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
8. RESULTADOS	26
8.1 ARTIGO 1	27
8.2 ARTIGO 2	35
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
10. PERSPECTIVAS FUTURAS	57
11. ANEXOS	58

1. APRESENTAÇÃO

Este trabalho compõem a tese de doutorado intitulada “Efeito da Estimulação Magnética Estática em cultura celular de neuroblastoma”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O trabalho é apresentado em três partes, na seguinte ordem: (1) Introdução, Revisão da Literatura, Justificativa e Objetivos; (2) dois Artigos Científicos e (3) Conclusões, Considerações Finais e Perspectivas Futuras.

Na primeira parte é feita uma revisão sobre o tema, abordando o que se sabe sobre Estimulação Magnética Estática (EME) e seus efeitos em células tumorais. A revisão de literatura demonstra a carência de estudos que busquem o entendimento do mecanismo de ação e efeitos EME em células de neuroblastoma, um câncer infantil agressivo. Com o intuito de elucidar estas questões, dois artigos foram desenvolvidos.

O primeiro artigo, intitulado "*Static Magnetic Stimulation Induces Cell-type Specific Alterations in the Viability of SH-SY5Y Neuroblastoma Cell Line*" (Estimulação Magnética Estática induz alterações do tipo célula específicas na viabilidade da linha celular de neuroblastoma SH-SY5Y) objetivou estabelecer um método de Estimulação Magnética Estática em cultura celular e avaliar o efeito de diferentes protocolos de exposição de campo estático em culturas celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y, de SH-SY5Y diferenciadas, de Melanoma Vaginal (HMV II) e de mesenquimais derivadas de adipócitos, utilizando parâmetros de toxicidade, morte, divisão celular e neuroplasticidade. Este artigo está publicado no *Journal Anticancer Research* (2020).

O segundo artigo, intitulado "*Static Magnetic Stimulation decreases viability, proliferation and autophagy of the SH-SY5Y cells*" (Estimulação Magnética Estática diminui a viabilidade, proliferação e autofagia das células SH-SY5Y), segue a linha de investigação do primeiro artigo buscando complementar os dados referentes ao potencial efeito da EME. Neste estudo foi desenvolvida uma curva de tempo de estimulação, utilizando a mesma intensidade utilizada no primeiro artigo, a fim de analisar se a resposta do EME é tempo-dependente. Adicionalmente foram avaliados os parâmetros a seguir: viabilidade, morte, ciclo e proliferação celular, assim como autofagia e quantidade mitocondrial.

Após a apresentação dos dois artigos, há uma conclusão geral e algumas considerações finais com perspectivas futuras. Em sequência, os anexos mais significativos são apresentados. Dessa forma, a tese procura contribuir para a compreensão da relação entre a EME em cultura celular e, principalmente, em células de neuroblastoma, como uma potencial ferramenta terapêutica.

2. INTRODUÇÃO

Estudos eletrofisiológicos têm aumentado muito o entendimento da atividade cerebral normal e em condições de doença. Os avanços tecnológicos podem ser observados em pesquisas de ponta em diversas áreas como neurologia, psiquiatria, psicologia e no incremento de terapias farmacológicas e não farmacológicas. Um dos grandes achados, a partir de estudos utilizando eletrofisiologia, tem sido a utilização de estimulação central (Noohi e Amirsalari, 2016).

Por mais de uma década, a estimulação cerebral não invasiva (*NIBS*, da sigla em inglês) tem sido utilizada para o tratamento de diversas doenças (Zhu et al., 2015). Nas últimas décadas tem havido um crescimento no uso de *NIBS* tais como Estimulação Magnética Transcraniana (EMT) ou Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) (Huang et al., 2005). No entanto, essas técnicas apresentam alguns efeitos colaterais que algumas vezes podem ser desconfortáveis aos pacientes (Nitsche et al., 2008). Consequentemente, têm sido investigadas outras alternativas não farmacológicas como a Estimulação Magnética Estática transcraniana (EMEt), uma nova técnica de neuromodulação que poderia superar alguns dos problemas apresentados pelas técnicas citadas anteriormente, entre eles o alto custo econômico.

A técnica de Estimulação Magnética Transcraniana baseia-se na geração de um campo magnético por meio de uma bobina acoplada a um gerador. Este campo magnético aplicado no escalpo produz uma corrente elétrica capaz de despolarizar a membrana neuronal (Barker et al., 1985; Rossi et al., 2009). O estímulo magnético atinge aproximadamente 2cm de profundidade, podendo variar de acordo com a bobina utilizada (Zangen et al., 2005). No entanto, este estímulo, além de atingir regiões corticais, pode influenciar também, de forma indireta, a atividade neuronal em regiões subcorticais (Lefaucheur, 2006).

A ETCC, por sua vez, requer dois eletrodos, um ânodo e um cátodo, que geralmente são colocados sobre o couro cabeludo. Seus efeitos são variáveis e dependem de vários fatores, como tamanho e montagem do eletrodo, duração da estimulação, densidade de corrente e características do tecido cerebral sob os eletrodos (Zettin et al., 2021). Busca-se com essa técnica produzir alteração no limiar de potencial de repouso da membrana plasmática e, consequentemente, modificações na plasticidade sináptica dos neurônios, ocorrendo portanto, a ativação do sistema inibitório (Cioato et al., 2016).

O uso de ímãs estáticos no Sistema Nervoso Central (SNC) é uma técnica emergente de neuromodulação não invasiva que oferece novas possibilidades de tratamento. Sua aplicação é simples, econômica e reversível. Traduzida para o contexto clínico, parece ser uma ferramenta segura e promissora no tratamento de doenças neurológicas (Viudes-Sarrion et al., 2021). Na

Figura 1 podemos ver como as técnicas agem a nível fisiológico e quais seus modos de ação.

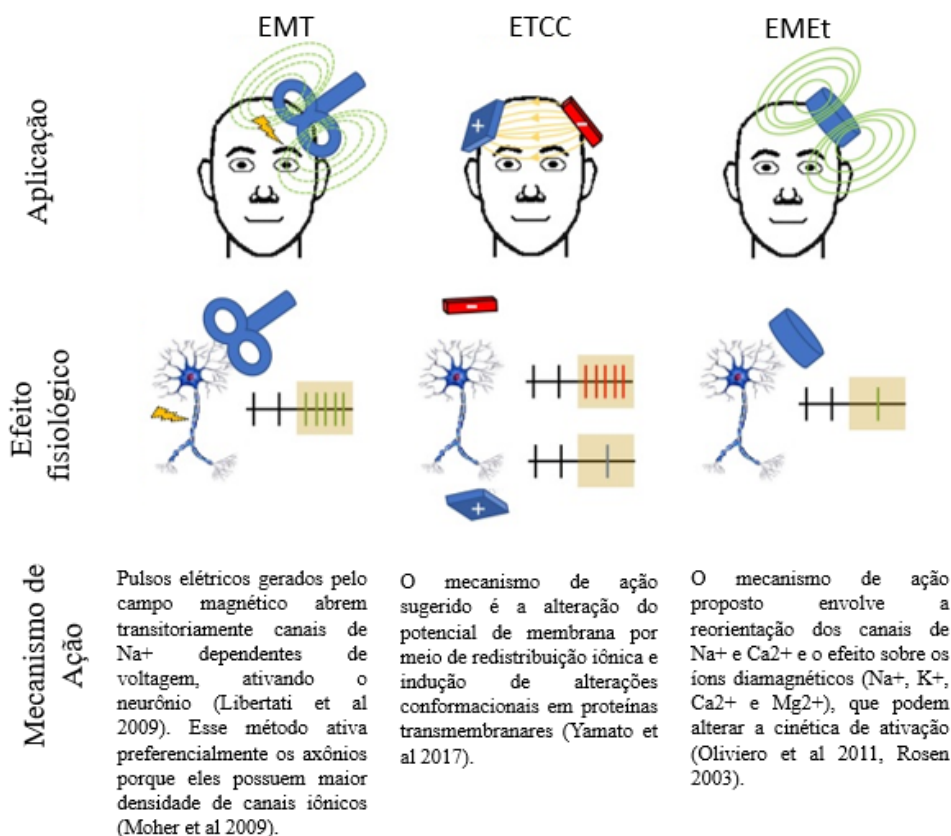


Figura 1. Diferenças entre EMT, ETCC e EME. Fonte: Viudes-Sarrion et al., 2021.

2.1. Efeitos da EME (Estimulação Magnética Estática) sobre modelos de cultura de células

Pouco se sabe sobre o efeito da EME, sendo necessários mais estudos para esclarecer seu efeito em nível molecular, celular e sistêmico. Foi proposto que uma mudança nas cargas positivas e negativas dos fosfolípidios da membrana ocorra durante a EME (Cavopol et al., 1995). Isso pode ser causado pela reorientação molecular de proteínas da membrana devido às forças de torque magnético homogêneo da EME em moléculas de membrana diamagnéticas e anisotrópicas (Lu et al., 2015; McLean et al., 2008). Por outro lado, Schenck argumentou que a maioria dos processos *in vitro* relacionados à geração de forças de torque por suscetibilidade anisotrópica são desprezíveis em condições *in vivo* (Schenck, 2000).

Alguns experimentos com animais sugerem que a alteração da função do canal iônico da membrana pode explicar, pelo menos parcialmente, os efeitos dos EME alterando a velocidade do limiar de ativação dos canais de sódio dependentes de voltagem (Coots et al., 2004; Luet al., 2015; Rosen, 2003a, b) e dos canais de cálcio (Lu et al., 2015; Rosen, 1996). Acredita-se que o influxo lento de cálcio e o aumento das reservas intracelulares de íons de cálcio desencadeados pela impedância dos canais de cálcio desencadeiam a depressão de longa duração (do inglês,

long term depression - LTD) nas células (Nakano et al., 2004; Paulus, 2011).

De maneira propícia, diversas metodologias envolvendo estimulações eletromagnéticas são aplicadas com o intuito de inibir a proliferação exacerbada de células, característica de doenças neoplásicas, como o câncer (Spyridopoulou et al., 2018). A utilização de técnicas de estimulação como a terapia de tratamento de campos (do inglês, *Tumor Treating Fields - TTFields*) é estudado sobre modelos tumorais *in vitro* e *in vivo* (Tatarov et al., 2011), demonstrando resultados positivos na inibição da divisão celular tumoral. *TTFields* atuam sobre a telófase e a citocinese, impedindo a formação de fuso mitótico funcional, inibindo a proliferação e gerando disrupção mitótica (Kirson et al., 2007; Zimmerman et al., 2012), além de exacerbar instabilidades genômicas (Harris et al., 2002), todas características de células cancerosas e de rápida divisão.

2.2. Propriedades Tumorais do Câncer

O câncer é uma patologia que tem sua origem no acúmulo de alterações adquiridas ao longo do tempo, envolvendo fatores de risco como predisposição genética e exposição a fatores de risco (radiação ionizante, deficiência do sistema imunológico, exposições ambientais, ocupacionais e obesidade) (American Cancer Society, 2019). Essas alterações, quando somadas, mudam o comportamento celular, fazendo com que muitos dos controles e características normais da célula sejam perdidos ou perturbados. Proliferação celular descontrolada e capacidade de sobrevivência alterada são aspectos comuns à maioria dos tipos de câncer. Geralmente apresentam também defeitos morfológicos e propriedades migratórias/invasivas, de acordo com o estágio de progressão da doença, podendo se tornar metastáticos e invadir outros tecidos (Hall, 2009; Piana et al., 2013).

A perda das características normais de uma célula e a aquisição de propriedades tumorais - como sinalização proliferativa sustentada, resistência à morte celular, imortalidade, indução de angiogênese e metástase - é denominada tumorigênese e é passível de atingir diversos tipos de tecidos do corpo humano (Hanahan and Weinberg, 2011). Os tumores do sistema nervoso central, por exemplo, são formados pelo crescimento de células anormais nos tecidos localizados no encéfalo e na medula espinhal, com maior incidência de novos casos ocorrendo no encéfalo (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019). Apesar de ser um tumor predominantemente adulto (gliomas), podem ser encontrados em crianças (meduloblastoma e neuroblastoma) (Stewart and Wild, 2014).

2.3. Epidemiologia do Câncer de Sistema Nervoso

Em termos de incidência mundial, o câncer do sistema nervoso central ocupa a décima terceira posição entre os homens e a décima sexta posição entre as mulheres (Ferlay et al., 2019). Em 2018, ocorreram 162 mil casos novos em homens e 134 mil em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 4,2/100 mil homens e 3,6/100 mil mulheres. As maiores taxas de incidência de câncer do sistema nervoso central estão nos países do Centro-Norte Europeu, em homens, e nos países do Sul da Europa e na América do Norte, em mulheres (Bray et al., 2018).

Em relação a mortalidade por neoplasia no Brasil, em 2019 ocorreram, 5.049 óbitos em homens, correspondendo ao risco de 5,0/100 mil e 4.663 óbitos em mulheres com risco de 4,6/100 mil (INCA, 2019). Os tratamentos utilizados são: quimioterapia multiagente com doxorrubicina, ciclofosfamida, uma droga de platina e etoposídeo e o sucesso das terapias varia de acordo com o grau de risco da doença. O número de ciclos de quimioterapia é baseado em fatores de risco clínicos e biológicos tumorais e na resposta à terapia (Twist et al., 2019). Em casos mais graves, além da quimioterapia podem ser utilizados cirurgia, radioterapia, terapia mieloablativa e, muitas vezes, transplante de células-tronco (Irwin et al., 2021).

Pacientes de risco baixo ou intermediário, com características tumorais biológicas favoráveis, apresentam altas taxas de sobrevida. Contudo, apesar dos avanços no conhecimento da biologia molecular e nas estratégias de tratamento, pacientes de alto risco ainda têm um prognóstico muito ruim (Bagatell et al., 2011; Berlanga et al., 2017; Carpenter and Mossé, 2012; Schulte et al., 2013)

Mundialmente, o câncer é uma das causas mais comuns de morte, com tratamentos disponíveis associados a numerosos efeitos adversos, aliado à pequena porcentagem de pacientes que atingem a completa remissão, promovendo a necessidade de novas estratégias terapêuticas (Bray et al., 2018).

2.4. Efeitos da EM sobre modelos tumorais

Campos magnéticos exercem sua função em múltiplos alvos. Uma revisão de literatura recente mostrou que o uso de campos magnéticos apresenta efeitos antitumorais por inibição da proliferação celular, indução de interrupção no ciclo celular, apoptose e autofagia (Xu et al., 2021).

A autofagia, um processo intracelular auto degradativo, é um mecanismo essencial da célula que facilita a renovação ou remoção de moléculas celulares, equilibrando assim o consumo de energia da célula e mantendo a homeostase (Rahman e Rhim, 2017; Rahman et al., 2020a). No entanto, a desregulação da autofagia é agora considerada uma das características mais definidoras para a progressão do tumor (White, 2015). Recentemente, foi revelado que a

supressão da autofagia combinado de quimioterápicos é um potencial tratamento para o câncer (Perez-Hernandez et al., 2019), embora isso dependa do contexto e do tipo de câncer. A expressão do marcador de autofagia, LC3-II, detectado por *Western blotting*, mostrou que EM (0,4T, 7,5 Hz, 4 h/dia) induziu a morte celular autofágica e suprimiu o crescimento do câncer em *in vitro* e *in vivo* (Xu et al., 2017).

As mitocôndrias são a primeira linha de defesa das células sob vários estresses. As mitocôndrias disfuncionais podem ser reparadas por um conjunto complexo de respostas adaptativas, como biogênese mitocondrial, fissão/fusão mitocondrial e mitofagia (Quiles and Gustafsson, 2020). A mitofagia tem como alvo as mitocôndrias danificadas através da fagocitose do autofagossomo e degradação lisossomal para garantir que elas sejam eliminadas antes que se tornem tóxicas para as células (Wang et al., 2022). Já a mitofagia deficiente e excessiva estão implicadas na patogênese de várias doenças associadas ao câncer, lesão miocárdica, diabetes, doenças hepáticas (Doblado et al., 2021).

Outro estudo, de 2011, analisou o ciclo celular após o uso de EME em leucemia mielóide, associado a adriamicina, e demonstrou que a proporção da fase G2/M aumenta, enquanto a concentração celular na fase S diminui significativamente, fazendo com que a célula não entre em divisão (Hao et al., 2011).

O tempo e intensidade escolhidos para EME são fundamentais, visto que o aumento da intensidade e do tempo de exposição a EME exibe uma diminuição acentuada na taxa de proliferação em células HeLa (adenocarcinoma) em comparação com células de fibroblastos. Aumentando a intensidade e o tempo, a taxa de proliferação diminuiu, sendo os tempos e intensidades 5, 10, 20 e 30 mT e 24, 48, 72 e 96 h (Zafari et al., 2015).

Desta forma, a avaliação dos efeitos da EME em modelo de linhagem celular de neuroblastoma se tornou o alvo de investigação para a prospecção, desenvolvimento e aplicação de diferentes metodologias de técnicas de estimulação central com potencial terapêutico para o tratamento de neoplasias. Fazendo-se necessários o desenvolvimento de estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* buscando elucidar as vias envolvidas nos efeitos neuromoduladores das técnicas de estimulação como a EME. Considerando a relevância do tema, o objetivo desta tese foi investigar os efeitos da Estimulação Magnética Estática (EME) sobre a viabilidade, morte, ciclo e proliferação celular, e autofagia e quantidade mitocondrial, testados em diferentes tempos de estimulação (6, 12, 24, 36h, 72 horas e 6 dias) com intensidade de 0,3T na linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y em cultura.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Nesta revisão de literatura, buscou-se ressaltar os principais aspectos relacionados ao campo magnético estático, câncer, neuroblastoma e proliferação celular. A estratégia envolveu busca de referências nas seguintes bases de dados: PubMed, SciELO e LILACS, utilizando artigos com datas de publicação entre 1990 e 2022.

Refinando-se a busca, com cruzamentos entre as palavras-chave, foi encontrado um reduzido número de artigos, sendo desenvolvida a revisão sistemática esquematizada na Figura 2.

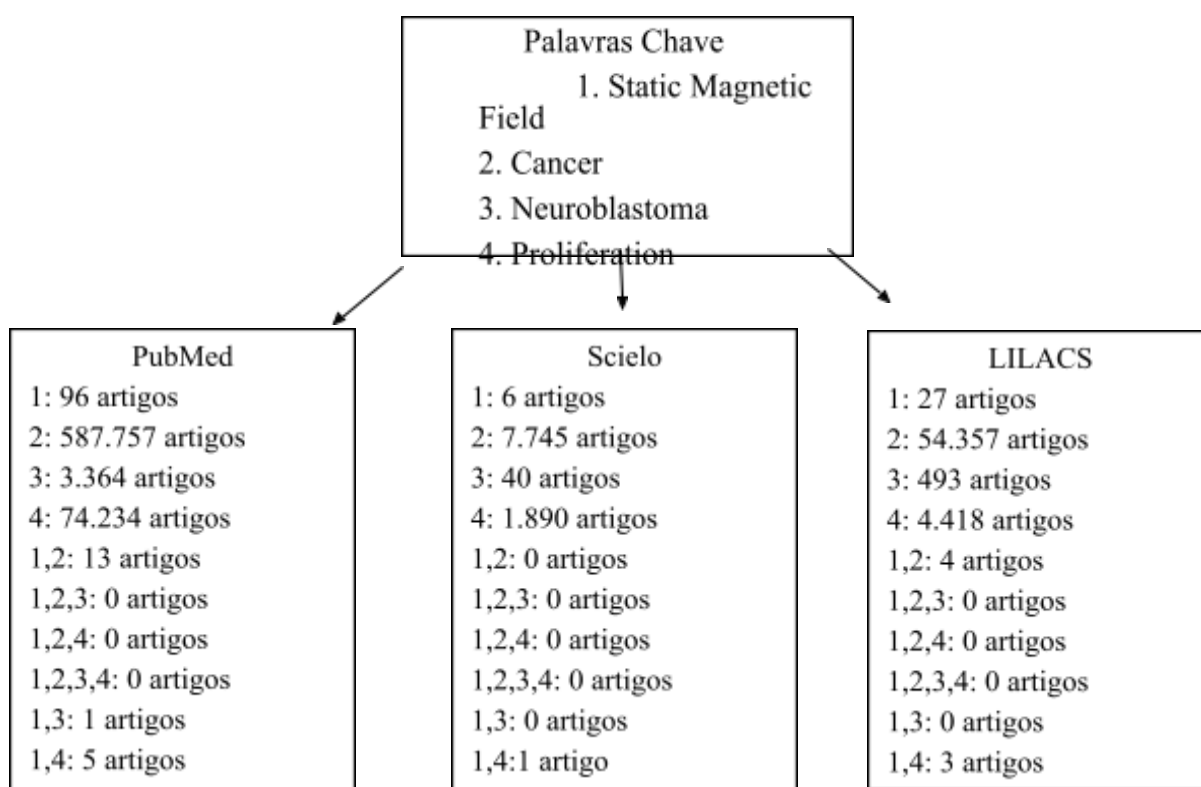


Figura 2 – Estratégias para localizar e selecionar as informações

4. MARCO CONCEITUAL

Primeiramente desenvolvemos um dispositivo para realizar a Estimulação Magnética Estática, após utilizamos três intensidades magnéticas e escolhemos uma para testar durante 24h e avaliar o efeito da EME, imediatamente e 24h após a exposição, com intuito de avaliar o efeito a longo tempo. Na figura 3, está o resumo de como foi elaborado o Artigo 1.

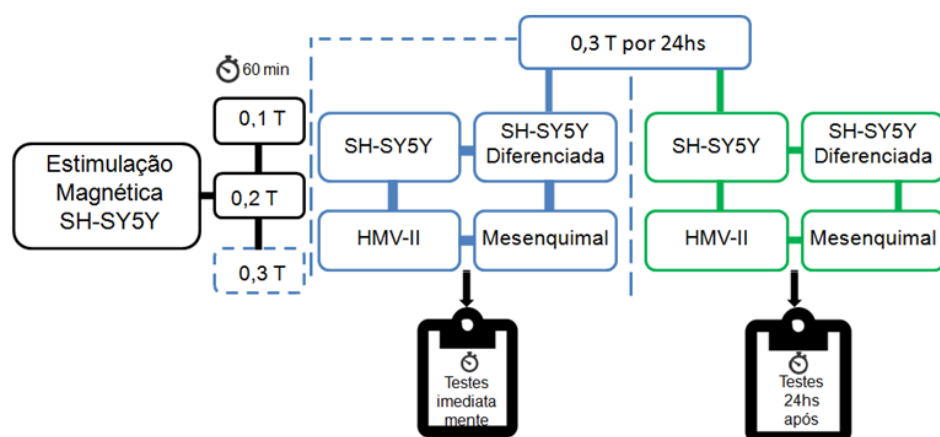


Figura 3. Marco conceitual exemplificando o Artigo 1.

A segunda parte do experimento foi realizada analisando a viabilidade celular em diversos tempos de exposição ao campo magnético estático de 0,3T. O mesmo teste foi realizado nas células de Melanoma Maligno Vaginal Humano. Prosseguiu-se então, com a investigação dos efeitos da EME em células de neuroblastoma, a fim de elucidar os mecanismos dos efeitos observados nos tempos de 24 horas e 6 dias, utilizando intensidade de 0,3T.

Na figura abaixo (Figura 3) está o marco conceitual que explica como as ideias se relacionam entre si e a forma que o Artigo 2 foi pensado. Desta maneira é possível ter uma visão condensada da própria investigação e de seus elementos essenciais.

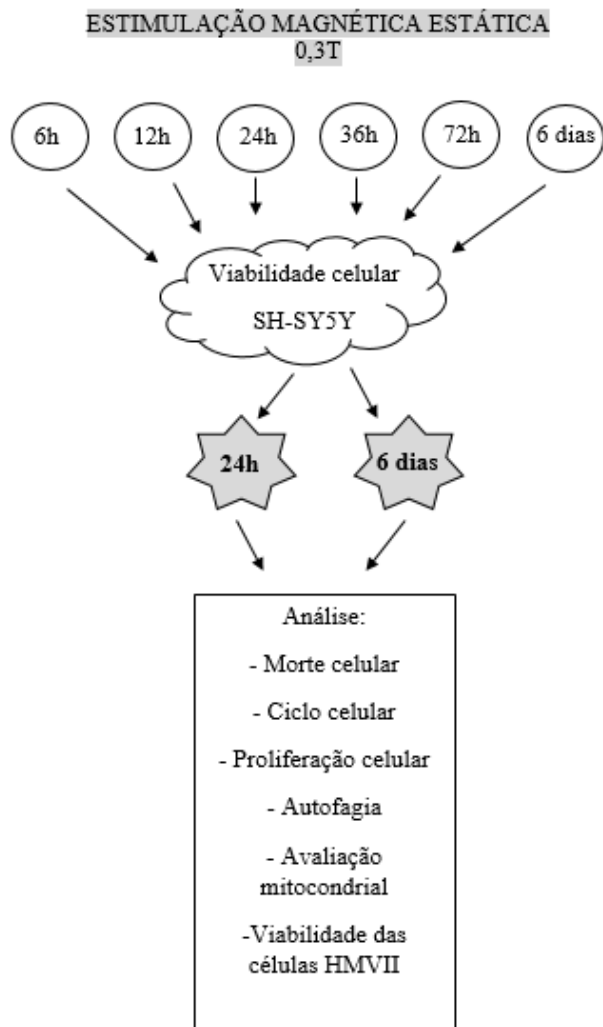


Figura 4. Marco conceitual exemplificando o Artigo 2.

5. JUSTIFICATIVA

O uso de ímãs estáticos no Sistema Nervoso Central (SNC) é uma técnica emergente de neuromodulação não invasiva que oferece novas possibilidades de tratamento. Sua aplicação é simples, econômica e reversível. Traduzida para o contexto clínico, parece ser uma ferramenta segura e promissora no tratamento de doenças neurológicas (Viudes-Sarrion et al., 2021). Desta forma e considerando dados prévios do grupo que demonstram diminuição na viabilidade celular de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y frente à EME, novos estudos se fazem necessários para um melhor entendimento dos mecanismos de ação da EME sobre células em cultura (Medeiros et al., 2020). A escassez de estudos relacionados à cultura celular frente às técnicas de estimulação magnética reveste de fundamental importância avaliar a toxicidade e as vias envolvidas nos efeitos desencadeados pela EME em cultura celular de neuroblastoma. Esta tese veio a colaborar com uma melhor compreensão dos mecanismos relacionados à resposta celular induzida pela EME em células tumorais, sugerindo um potencial translacional como terapia adjuvante no tratamento de neuroblastoma.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo primário

O presente projeto objetivou avaliar o efeito da exposição à Estimulação Magnética Estática em cultura celular. Para tanto foi investigado os efeitos da Estimulação Magnética Estática (EME) sobre a viabilidade, morte, ciclo e proliferação celular, e autofagia e quantidade mitocondrial.

6.2 Objetivos Artigo 1

1. Desenvolver um modelo de placas magnéticas compatíveis com placas de cultura celular para exposição das células ao campo magnético estático.
2. Avaliar a viabilidade celular após 24h de exposição à 0,3 T logo após o teste e 24h depois da EME em culturas de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, de melanoma vaginal, de neuroblastoma diferenciado em células neuronais e de mesenquimais derivadas de adipócitos, utilizando ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolina).
3. Avaliar a morte e ciclo celular após 24h de exposição à 0,3 T logo após o teste e 24h depois da EME em culturas de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, utilizando ensaio de Hoescht33342 e PI (Iodeto de Propídeo).
4. Avaliar expressão do gene $Trk-\beta$ em culturas de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y e de neuroblastoma diferenciado em células neuronais (PCR em Tempo Real).

6.3 Objetivos Artigo 2

1. Avaliar os efeitos da intensidade do campo magnético de 0,3 T à diferentes tempos de exposição sobre a viabilidade celular das células de neuroblastoma e células de mucosa vaginal, utilizando ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolina).
2. Avaliar os efeitos da intensidade do campo magnético de 0,3 T à 24h e 6 dias de exposição sobre a morte celular das células de neuroblastoma, utilizando o ensaio de Anexina-V/PI.
3. Avaliar os efeitos da intensidade do campo magnético de 0,3 T à 24h e 6 dias de exposição sobre o ciclo celular das células de neuroblastoma, utilizando o ensaio de marcação de PI.
4. Avaliar os efeitos da intensidade do campo magnético de 0,3 T à 24h e 6 dias de exposição sobre a proliferação celular das células de neuroblastoma, utilizando o ensaio de CFSE (Carboxifluoresceína succinimidil éster).
5. Avaliar os efeitos da intensidade do campo magnético de 0,3 T à 24h e 6 dias de exposição sobre a autofagia celular das células de neuroblastoma, utilizando o ensaio de Laranja de

Acridina.

6. Avaliar os efeitos da intensidade do campo magnético de 0,3 T à 24h e 6 dias de exposição sobre a quantidade total de mitocôndrias das células de neuroblastoma, utilizando o ensaio Mitotracker.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bagatell, R., London, W.B., Wagner, L.M., Voss, S.D., Stewart, C.F., Maris, J.M., Kretschmar, C., Cohn, S.L., 2011. Phase II study of irinotecan and temozolomide in children with relapsed or refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol* 29, 208–213. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.7107>
- Barker, A.T., Jalinous, R., Freeston, I.L., 1985. NON-INVASIVE MAGNETIC STIMULATION OF HUMAN MOTOR CORTEX. *The Lancet* 325, 1106–1107. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(85\)92413-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(85)92413-4)
- Berkelmann, L., Bader, A., Meshksar, S., Dierks, A., Hatipoglu Majernik, G., Krauss, J.K., Schwabe, K., Manteuffel, D., Ngezahayo, A., 2019. Tumour-treating fields (TTFields): Investigations on the mechanism of action by electromagnetic exposure of cells in telophase/cytokinesis. *Sci Rep* 9, 7362. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43621-9>
- Berlanga, P., Cañete, A., Castel, V., 2017. Advances in emerging drugs for the treatment of neuroblastoma. *Expert Opin Emerg Drugs* 22, 63–75. <https://doi.org/10.1080/14728214.2017.1294159>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Câncer do sistema nervoso central [WWW Document], 2018. . INCA - Instituto Nacional de Câncer. URL <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-sistema-nervoso-central> (accessed 2.21.22).
- Cancer Facts & Figures 2019 | American Cancer Society [WWW Document], n.d. URL <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2019.html> (accessed 2.21.22).
- Carpenter, E.L., Mossé, Y.P., 2012. Targeting ALK in neuroblastoma--preclinical and clinical advancements. *Nat Rev Clin Oncol* 9, 391–399. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.72>
- Cavopoli, A.V., Wamil, A.W., Holcomb, R.R., McLean, M.J., 1995. Measurement and analysis of static magnetic fields that block action potentials in cultured neurons. *Bioelectromagnetics* 16, 197–206. <https://doi.org/10.1002/bem.2250160308>
- Cioato, S.G., Medeiros, L.F., Marques Filho, P.R., Vercelino, R., de Souza, A., Scarabelot, V.L., de Oliveira, C., Adachi, L.N.S., Fregni, F., Caumo, W., Torres, I.L.S., 2016. Long-Lasting Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in the Reversal of Hyperalgesia and Cytokine Alterations Induced by the Neuropathic Pain Model. *Brain Stimul* 9, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2015.12.001>
- Doblado, L., Lueck, C., Rey, C., Samhan-Arias, A.K., Prieto, I., Stacchiotti, A., Monsalve, M., 2021. Mitophagy in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 3903. <https://doi.org/10.3390/ijms22083903>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. m., Piñeros, M., Znaor, A., Bray, F., 2019. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer* 144, 1941–1953.

<https://doi.org/10.1002/ijc.31937>

Hall, A., 2009. The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28, 5–14.
<https://doi.org/10.1007/s10555-008-9166-3>

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Hao, Q., Wenfang, C., Xia, A., Qiang, W., Ying, L., Kun, Z., Runguang, S., 2011. Effects of a moderate-intensity static magnetic field and adriamycin on K562 cells. *Bioelectromagnetics* 32, 191–199. <https://doi.org/10.1002/bem.20625>

Harris, P.A., Lamb, J., Heaton, B., Wheatley, D.N., 2002. Possible attenuation of the G2 DNA damage cell cycle checkpoint in HeLa cells by extremely low frequency (ELF) electromagnetic fields. *Cancer Cell Int* 2, 3. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-2-3>

Huang, Y.-Z., Edwards, M.J., Rounis, E., Bhatia, K.P., Rothwell, J.C., 2005. Theta Burst Stimulation of the Human Motor Cortex. *Neuron* 45, 201–206.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.033>

Irwin, M.S., Naranjo, A., Zhang, F.F., Cohn, S.L., London, W.B., Gastier-Foster, J.M., Ramirez, N.C., Pfau, R., Reshmi, S., Wagner, E., Nuchtern, J., Asgharzadeh, S., Shimada, H., Maris, J.M., Bagatell, R., Park, J.R., Hogarty, M.D., 2021. Revised Neuroblastoma Risk Classification System: A Report From the Children’s Oncology Group. *JCO* 39, 3229–3241.
<https://doi.org/10.1200/JCO.21.00278>

Kirson, E.D., Dbalý, V., Tovaryš, F., Vymazal, J., Soustiel, J.F., Itzhaki, A., Mordechovich, D., Steinberg-Shapira, S., Gurvich, Z., Schneiderman, R., Wasserman, Y., Salzberg, M., Ryffel, B., Goldsher, D., Dekel, E., Palti, Y., 2007. Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10152–10157.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0702916104>

Lefaucheur, J.P., 2006. The use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in chronic neuropathic pain. *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology* 36, 117–124.
<https://doi.org/10.1016/j.neucli.2006.08.002>

Lu, X.-W., Du, L., Kou, L., Song, N., Zhang, Y.-J., Wu, M.-K., Shen, J.-F., 2015. Effects of moderate static magnetic fields on the voltage-gated sodium and calcium channel currents in trigeminal ganglion neurons. *Electromagn Biol Med* 34, 285–292.
<https://doi.org/10.3109/15368378.2014.906448>

McLean, M.J., Engström, S., Qinkun, Z., Spankovich, C., Polley, D.B., Polley, D., 2008. Effects of a static magnetic field on audiogenic seizures in black Swiss mice. *Epilepsy Res* 80, 119–131.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2008.03.022>

Medeiros, H.R., Assumpcao, J.A.F., Medeiros, L.F., Stapenhorst, M., Nunes, L., Henckes, N.A.C., Cruz, C.U., Fregni, F., Sanches, P.R.S., Oliveira, F.S.O., Caumo, W., Cirne-Lima, E.O., Torres, I.L.S., 2020. Static Magnetic Stimulation Induces Cell-type Specific Alterations in the Viability of SH-SY5Y Neuroblastoma Cell Line. *Anticancer Res* 40, 5151–5158.
<https://doi.org/10.21873/anticancer.14518>

Nitsche, M.A., Cohen, L.G., Wassermann, E.M., Priori, A., Lang, N., Antal, A., Paulus, W.,

- Hummel, F., Boggio, P.S., Fregni, F., Pascual-Leone, A., 2008. Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain Stimulation: Basic, Translational, and Clinical Research in Neuromodulation* 1, 206–223. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2008.06.004>
- NOOHI, S., AMIRSALARI, S., 2016. History, Studies and Specific Uses of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) in Treating Epilepsy. *Iran J Child Neurol* 10, 1–8.
- Piana, S., Ragazzi, M., Tallini, G., de Biase, D., Ciarrocchi, A., Frasoldati, A., Rosai, J., 2013. Papillary thyroid microcarcinoma with fatal outcome: evidence of tumor progression in lymph node metastases: report of 3 cases, with morphological and molecular analysis. *Hum Pathol* 44, 556–565. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.06.019>
- Pérez-Hernández, M., Arias, A., Martínez-García, D., Pérez-Tomás, R., Quesada, R., Soto-Cerrato, V., 2019. Targeting Autophagy for Cancer Treatment and Tumor Chemosensitization. *Cancers (Basel)* 11, E1599. <https://doi.org/10.3390/cancers11101599>
- Quiles, J.M., Gustafsson, Å.B., 2020. Mitochondrial Quality Control and Cellular Proteostasis: Two Sides of the Same Coin. *Front Physiol* 11, 515. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00515>
- Rahman, M.A., Rahman, M.D.H., Hossain, M.S., Biswas, P., Islam, R., Uddin, M.J., Rahman, M.H., Rhim, H., 2020. Molecular Insights into the Multifunctional Role of Natural Compounds: Autophagy Modulation and Cancer Prevention. *Biomedicines* 8, E517. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8110517>
- Rahman, M.A., Rhim, H., 2017. Therapeutic implication of autophagy in neurodegenerative diseases. *BMB Rep* 50, 345–354. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2017.50.7.069>
- Rossi, S., Hallett, M., Rossini, P.M., Pascual-Leone, A., 2009. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clin Neurophysiol* 120, 2008–2039. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2009.08.016>
- Schenck, J.F. (2000), Safety of Strong, Static Magnetic Fields. *J. Magn. Reson. Imaging*, 12: 2-19. [https://doi.org/10.1002/1522-2586\(200007\)12:1<2::AID-JMRI2>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1522-2586(200007)12:1<2::AID-JMRI2>3.0.CO;2-V)
- Schulte, J., Schulte, S., Heukamp, L., Astrahantseff, K., Stephan, H., Fischer, M., Schramm, A., Eggert, A., 2013. Targeted Therapy for Neuroblastoma: ALK Inhibitors. *Klinische Padiatrie* 225. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1357132>
- Spyridopoulou, K., Makridis, A., Maniotis, N., Karypidou, N., Myrovali, E., Samaras, T., Angelakeris, M., Chlichlia, K., Kalogirou, O., 2018. Effect of low frequency magnetic fields on the growth of MNP-treated HT29 colon cancer cells. *Nanotechnology* 29, 175101. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aaea9>
- Stewart, B.W., Wild, C., 2014. World cancer report 2014.
- Tatarov, I., Panda, A., Petkov, D., Kolappaswamy, K., Thompson, K., Kavirayani, A., Lipsky, M.M., Elson, E., Davis, C.C., Martin, S.S., DeTolla, L.J., 2011. Effect of magnetic fields on tumor growth and viability. *Comp Med* 61, 339–345.
- Twist, C.J., Schmidt, M.L., Naranjo, A., London, W.B., Tenney, S.C., Marachelian, A., Shimada, H., Collins, M.H., Esiashvili, N., Adkins, E.S., Mattei, P., Handler, M., Katzenstein, H., Attiyeh, E., Hogarty, M.D., Gastier-Foster, J., Wagner, E., Matthay, K.K., Park, J.R., Maris,

- J.M., Cohn, S.L., 2019. Maintaining Outstanding Outcomes Using Response- and Biology-Based Therapy for Intermediate-Risk Neuroblastoma: A Report From the Children's Oncology Group Study ANBL0531. *J Clin Oncol* 37, 3243–3255.
<https://doi.org/10.1200/JCO.19.00919>
- Viudes-Sarrion, N., Velasco, E., Delicado-Miralles, M., Lillo-Navarro, C., 2021. Static magnetic stimulation in the central nervous system: a systematic review. *Neurol Sci* 42, 1733–1749.
<https://doi.org/10.1007/s10072-021-05156-8>
- Wang, G., Fan, Y., Cao, P., Tan, K., 2022. Insight into the mitochondrial unfolded protein response and cancer: opportunities and challenges. *Cell Biosci* 12, 18.
<https://doi.org/10.1186/s13578-022-00747-0>
- White, E., 2015. The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest* 125, 42–46.
<https://doi.org/10.1172/JCI73941>
- Xu, A., Wang, Q., Lv, X., Lin, T., 2021. Progressive Study on the Non-thermal Effects of Magnetic Field Therapy in Oncology. *Front Oncol* 11, 638146.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2021.638146>
- Xu, Y., Wang, Y., Yao, A., Xu, Z., Dou, H., Shen, S., Hou, Y., Wang, T., 2017. Low Frequency Magnetic Fields Induce Autophagy-associated Cell Death in Lung Cancer through miR-486-mediated Inhibition of Akt/mTOR Signaling Pathway. *Sci Rep* 7, 11776.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-10407-w>
- Zafari, J., Javani Jouni, F., Abdolmaleki, P., Jalali, A., Khodayar, M.J., 2015. Investigation on the effect of static magnetic field up to 30 mT on viability percent, proliferation rate and IC50 of HeLa and fibroblast cells. *Electromagn Biol Med* 34, 216–220.
<https://doi.org/10.3109/15368378.2015.1076452>
- Zangen, A., Roth, Y., Voller, B., Hallett, M., 2005. Transcranial magnetic stimulation of deep brain regions: evidence for efficacy of the H-Coil. *Clinical Neurophysiology* 116, 775–779.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2004.11.008>
- Zettin, M., Bondesan, C., Nada, G., Varini, M., Dimitri, D., 2021. Transcranial Direct-Current Stimulation and Behavioral Training, a Promising Tool for a Tailor-Made Post-stroke Aphasia Rehabilitation: A Review. *Front Hum Neurosci* 15, 742136.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.742136>
- Zhu, H., Lu, Z., Jin, Y., Duan, X., Teng, J., Duan, D., 2015. Low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on Parkinson motor function: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Acta Neuropsychiatrica* 27, 82–89. <https://doi.org/10.1017/neu.2014.43>
- Zimmerman, J.W., Pennison, M.J., Brezovich, I., Yi, N., Yang, C.T., Ramaker, R., Absher, D., Myers, R.M., Kuster, N., Costa, F.P., Barbault, A., Pasche, B., 2012. Cancer cell proliferation is inhibited by specific modulation frequencies. *Br J Cancer* 106, 307–313.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2011.523>

8. RESULTADOS

8.1 ARTIGO 1

Static Magnetic Stimulation Induces Cell-type Specific Alterations in the Viability of SH-SY5Y Neuroblastoma Cell Line

Helouise R. Medeiros^{1,2,3}, José A. F. Assumpcao^{1,2}, Liciane F. Medeiros², Martina Stapenhorst³, Lara Nunes³, Nicole A.C. Henckes³, Carolina Uribe Cruz⁴, Felipe Fregni⁵, Paulo R.S. Sanches⁶, Fernanda S.O. Oliveira³, Wolnei Caumo^{1,2}, Elizabeth O. Cirne-Lima³ and Iraci L.S. Torres^{1,2*}

¹PostGraduate Program in Medicine: Medical Sciences, Faculty of Medicine, Universidade do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil;

²Translational Nucleus: Pain Pharmacology and Neuromodulation, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil;

³Embryology and Cell Differentiation Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil;

⁴Experimental Laboratory of Hepatology and Gastroenterology, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil;

⁵Laboratory of Neuromodulation, Department of Physical Medicine & Rehabilitation, Spaulding Rehabilitation Hospital & Massachusetts General Hospital Harvard Medical School and Center for Non-invasive Brain Stimulation, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA, U.S.A.;

⁶Biomedical Engineering Laboratory, Research and Post Graduate Group, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract. Background/Aim: Magnetic stimulation is used in the treatment of a diversity of diseases, but a complete understanding of the underlying mechanisms of action requires further investigation. We examined the effect of static magnetic stimulation (SMS) in different cell lines. **Materials and Methods:** A culture plate holder with attached NeFeB magnets was developed. Different magnetic field intensities and periods were tested in tumoral and non-tumoral cell lines. To verify the cellular responses to SMS, cell viability, cell death, cell cycle and BDNF expression were evaluated. **Results:** Exposure of SH-SY5Y cells to SMS for 24 hours led to a decrease in cell viability. Analysis 24 h after stimulation revealed a decrease in apoptotic and double-positive cells, associated with an increase in the number of necrotic cells. **Conclusion:** The effects of SMS on cell viability are cell type-specific, inducing a decrease in

cell viability in SH-SY5Y cells. This suggests that SMS may be a potential tool in the treatment of neuronal tumors.

Key Words: Static magnetic stimulation, neuroblastoma, cell viability, cell death, cell cycle.

Correspondence to: Iraci L. S. Torres (ORCID: 0000-0002-3081- 115X), Laboratory of Pain Pharmacology and Neuromodulation: Pre-clinical Research, Center of Experimental Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Porto Alegre, RS, 90035-007, Brazil. Tel: +55 5133598937, e-mail: iltorres@hcpa.edu.br

INTRODUCTION

Over the years, several electrophysiological studies have expanded the understanding of normal brain activity and its pathological conditions. Technological advances have been an important part of the improvement of therapies and research in several areas such as neurology, psychology, and psychiatry (1). Brain stimulation is a tool for modulating brain function, allowing the association of activity patterns and cognitive function to establish cause-consequence relations (2). Brain stimulation techniques are usually divided into two different types: invasive and non-invasive (NIBS) techniques. Whereas invasive techniques involve greater risk for patients, as demonstrated by studies that compare the impact of different procedures (3, 4), non- invasive techniques have shown favorable results together with lower risks (3, 5). Indeed, NIBS's application has been described in different scenarios: 1. Cognitive improvement on depression (6, 7); 2. Improvement in post-stroke recovery (8); 3. Improvement of the memory and the quality of life of patients with Alzheimer's disease (9, 10); 4. Relief of chronic pain (11, 12). These findings, alongside a reduction in induced adverse effects, set NIBS as promising alternatives for the treatment of several diseases and neurological disorders (13).

Recently, in vitro studies reporting stimulation using non- invasive techniques have been reported. Potential uses and effects of magnetic stimulation over cellular processes have been described, particularly using static magnetic stimulation (SMS). Apart from physiological and homeostatic events, such as wound healing (14), SMS has shown effects in cancer models of glioblastoma (15), adenocarcinoma (16) and leukemia (17), where it has been shown to control the cell cycle, reduce drug resistance to cisplatin and enhance natural killer cell cytotoxicity against tumor cells, respectively.

SMS, unlike repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) – in which changes in the magnetic field create an electric current through electromagnetic induction - does not induce

electric currents; however, it has been shown to influence a variety of biological systems (18). Transcranial stimulation with a static magnetic field applied in humans reduces the excitability of the motor cortex for a few minutes after the end of the stimulation (19). Few studies have explained the effects of SMS on nervous cells. A comparison between renal cells and cortical astrocytes in rats showed that SMS decreases proliferation and increases apoptosis and necrosis in renal treated cells, while the opposite effect was seen in cortical astrocytes; stimulated cells showed more proliferation and less cell death (20). These results suggest that different cell types can respond differently to SMS.

Immortalized cell lines are widely used models for in vitro studies, for their ease of maintenance, high proliferative rates, highly homogenous and reproducible results (21). In this context, the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y is often used for neuronal cell studies, since SH-SY5Y cells can be differentiated in dopaminergic neurons (22).

This study aimed to establish a method for in vitro SMS, to investigate its effects on cell viability, cell death and the cell cycle of different cell lines, and determine whether the responses are cell type specific.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and differentiation. Adipose-derived mesenchymal stem cells, human vaginal malignant melanoma HMVII cell line and human neuroblastoma SH-SY5Y cell line, were obtained from the Banco de Células do Estado do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brazil). Mesenchymal stem cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 20% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO) and 1% Penicillin/Streptomycin (GIBCO) at 37°C and 5% CO₂. HMVII cells were maintained in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 (GIBCO) supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 1% penicillin/streptomycin (GIBCO) at 37°C and 5% CO₂. SH-SY5Y cells were maintained in 1:1 Ham's F12 and DMEM Low Glucose (GIBCO) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (GIBCO), and 1% penicillin/streptomycin (GIBCO) at 37°C and 5% CO₂. Cells were passaged at 80-90% confluency. Cells were seeded in 24-well plates (using only 6 wells per plate, according to Figure 1) at a density of 1×10⁶ cells per well and kept at 37°C and 5% CO₂. Differentiation was induced 24 h after plating using 1:1 Ham's F12 and DMEM Low Glucose (GIBCO) supplemented with 1% heat-inactivated FBS (GIBCO), 1% penicillin/streptomycin (GIBCO) and 10 μM Retinoic Acid (RA). The RA-containing culture medium was replaced every three days until day 10. Evaluation of cell morphology and

differentiation was done using phase-contrast light microscopy.

Static magnetic stimulation (SMS). Stimulation with SMS was done using a specially designed stand for attachment of standard 24 well plates. Each stand contains six NdFeB (neodymium-iron-boron) magnets with cylindrical shape (12 mm diameter and 6 mm height), spaced out so that the magnetic fields do not interact (Figures 1 and 2). The distribution of the magnets is made so that they are coupled exactly to 6 wells of a 24-well plate. Each 24-well plate, therefore, is seeded in only 6 wells. There is an adjustment for the distance between the culture plate and the stand to guarantee the strength of the magnetic field. The magnetic field traversed a layer or several layers of cells, in the same way, i.e., cell grouping, or density does not change the field's intensity. The adjustment of the magnetic field was performed with a customized screw, and the measurement of the magnetic field was done using a Hall Effect Gaussmeter (Wuntronic GmbH, Germany), available at the HCPA Biomedical Engineering Laboratory. Stimulation for the initial MTT assay using only the SH-SY5Y cell line was done using intensities of 0.1 T, 0.2 T and 0.3 T ($\pm 2\%$ tolerance), for 60 min. The remaining stimulations were performed for 24 h from plating, with an intensity of 0.3 T. Control groups did not receive stimulation. The 48-h group received stimulation during the first 24 h only.

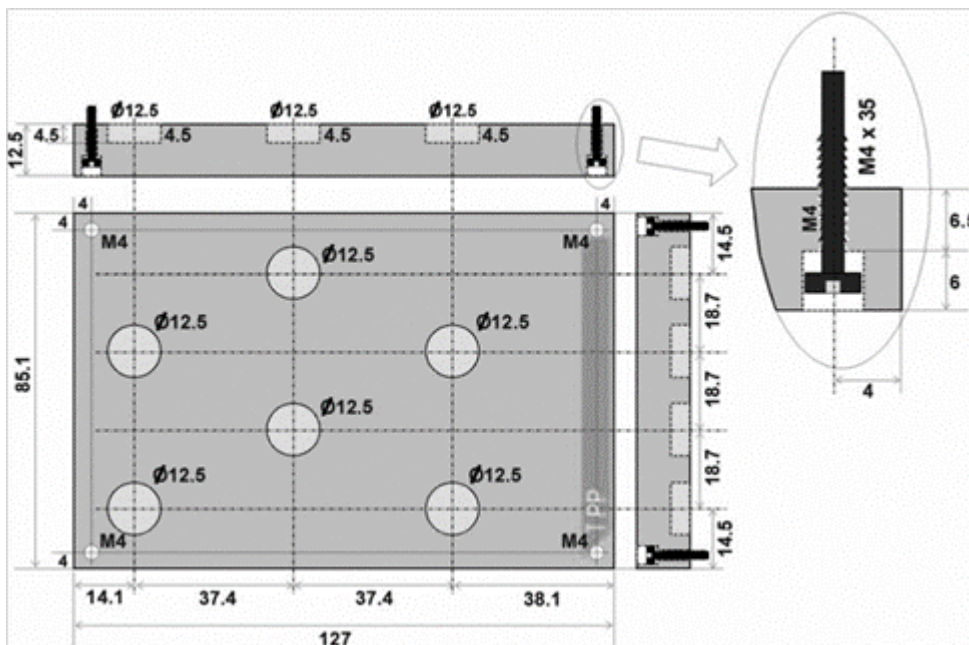


Figure 1. Schematic for the static magnetic stimulation device.

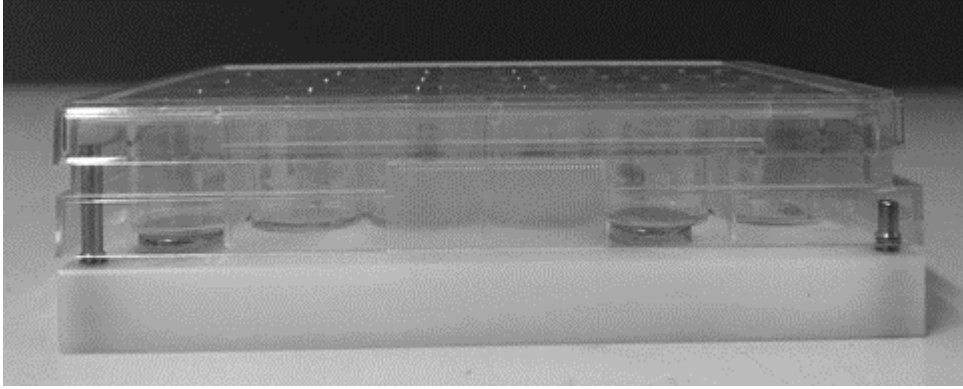


Figure 2. Cell culture plate placed on SMS device.

MTT assay. The MTT assay 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma Aldrich, Brazil) is a colorimetric assay that reflects cell viability. Immediately and 24 h after SMS exposure, cells were incubated with MTT in saline (132 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 6 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4). Without removing the medium from the cells, 0.75 mg/ml MTT was added, incubated for 1 h at 37°C and dimethyl sulfoxide (DMSO) was added for cell disruption. The absorbance was determined at a wavelength of 570 nm, using a wavelength of 620 nm as a reference in a spectrophotometer. Cell viability was expressed as a percentage relative to the absorbance determined in the control cells.

Cell death (PI/Hoechst staining). Viable and dying cells were identified after staining of the nuclei with Propidium Iodide (PI) (Thermo Fischer, Carlsbad, CA, USA) and Hoechst 33342 (HO) (Sigma Aldrich, Willow Creek Road, Eugene, EUA). The cells were incubated in a solution containing PI and HO 5 mg/ml for 15 min and visualized by fluorescence microscopy. To quantify the number of dead/alive cells, ten photos per well were taken, randomly chosen. Images were analyzed using ImageJ software.

Cell death (Annexin-V/PI staining). Annexin-V/PI staining was performed to obtain a more detailed profiling of SH-SY5Y cell death. Apoptotic cells lose the asymmetric disposition of membrane components and proteins, such as phosphatidylserine residues, usually found on the inside sheet of the plasma membrane. Upon entering apoptosis, these proteins are exposed to the outer sheet of the plasma membrane, where it is made available for Annexin-V-FITC staining. On the other hand, necrotic cells lose membrane integrity and are, therefore, positively stained using PI. In this manner, the different events surrounding cell death can be distinguished from one another according to different staining profiles. Double-positive cells do not have a clear phenotype. These cells can be either late-stage apoptotic or necrotic cells. Apoptotic cells (Annexin-V+/PI-), necrotic cells (Annexin-V-/PI+), and alive cells (Annexin-V-/PI-) are

quantified through flow cytometry. After treatments, the samples were washed with PBS, resuspended in 100 µl of Annexin-V Binding Buffer 1X and incubated with 2.5 µl of Annexin-V FITC for 15 min, at room temperature, protected from light. The samples were incubated in Propidium Iodide solution (2 µg/ml), an additional fluorescent marker, in Annexin-V Binding Buffer 1X for 5 min at 4°C protected from light. Alive cells show membrane integrity, which prevents PI from entering the cell and staining nucleic acids (RNA and/or DNA). The samples were immediately analyzed by flow cytometry using the Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystem- Life- Thermo). As an experimental control, apoptosis was induced using 20% DMSO for 15 min and necrotic cells were obtained by heating the cells at 70°C for 15 min.

BDNF expression. Total RNA was extracted as recommended by the manufacturer using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Austin, TX, USA). Complementary DNA was synthesized from 1 µg RNA using SuperScriptVILOtm (Invitrogen, Brazil). PCR reactions were prepared using MasterMix TaqMan (Applied Biosystems, Germantown, MD, USA) and StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Real-time PCR was optimized to run under the initial incubation conditions of 95°C for 2 min, denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 60°C for 1 min, for 45 cycles. The expression of the BDNF gene was normalized with the Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) with $\Delta\Delta CT$ correlation.

Statistical analysis. The first analyses were normality and lognormality to choose between a parametric or non-parametric test. For parametric samples, data are presented as mean±SD and analyzed using Student's t-test. For non-parametric samples, data are presented as median (interquartile 25; interquartile 75) and analyzed using Kruskal–Wallis followed by Mann–Whitney test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. All analyses were performed using the statistical software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

RESULTS

Cell viability and cell death. MTT was performed to evaluate the SMS effects on the cell viability (Figure 3). SH-SY5Y cells were stimulated with SMS for 60 min in three different intensities (0.1 T, 0.2 T and 0.3 T). There was no significant difference between control cells and cells exposed to the three different SMS intensities (0.1 T, 0.2 T and 0.3 T) (Kruskal–Wallis, $p > 0.05$). Based on these results, the highest intensity (0.3 T) and longer exposure time (24 h) were chosen for further analysis of cell viability (Figure 4). SH-SY5Y cells, evaluated immediately after 24 h of SMS exposure, presented a significant decrease in viability when compared to the control group (Student's t-test, $p < 0.05$). Stimulated SH-SY5Y cells evaluated

24 h after SMS exposure did not present a significant difference in viability when compared to the control group (Kruskal–Wallis $p>0.05$). In differentiated SH-SY5Y, adipose-derived mesenchymal and HMVII cells, no difference in viability was found after SMS exposure for both evaluated periods (immediately and after 24 h of SMS exposure) (Student’s t-test or Kruskal–Wallis, $p>0.05$). In SH-SY5Y cells, PI/HO analysis of cell death (Figure 5) showed no significant difference after SMS exposure, suggesting there was no increase in cell death in these cells (Student’s t-test or Kruskal–Wallis, $p>0.05$). Similarly, in differentiated SH-SY5Y no difference was found (Student’s t-test or Kruskal–Wallis $p>0.05$). Annexin-V/PI evaluation (Figure 6) showed a decrease in apoptotic (Annex+/PI) (1.594% to 0.004%, Figure 6B) and double-positive (Annex+/PI+) cells (0.086% to 0.190%, Figure 6D), and an increase in necrotic (Annex-/PI+) (0.359% to 1.580%, Figure 6C) SH-SY5Y cells exposed to SMS for 24 h and analyzed 24 h after the stimulation (48 h) (Kruskal–Wallis, $p<0.05$, Figure 6). In groups evaluated immediately after 24 h of exposure to SMS (24 h), there was a decrease in double-positive (Annex+/PI+) cells (0.150% to 0.130%, Figure 6D).

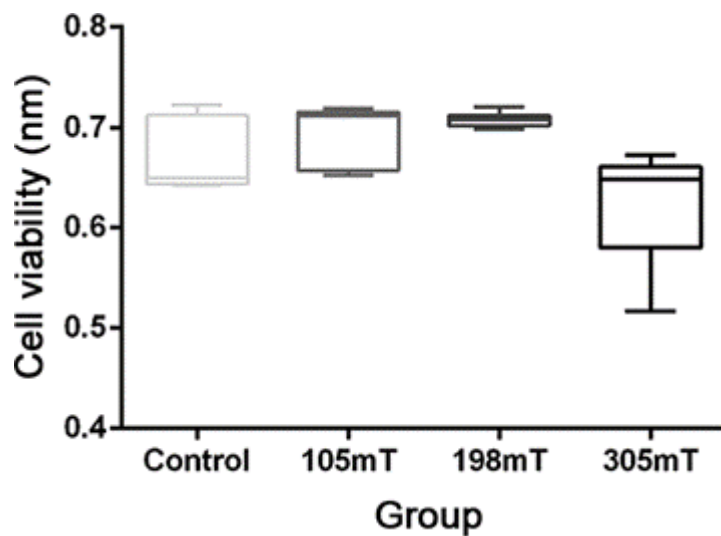


Figure 3. Cell viability of SH-SY5Y cells exposed to different intensities of SMS. Cells were exposed to 0.1 T, 0.2 T, 0.3 T SMS for 60 min and analyzed using MTT. Results are presented in nm. Results are presented in nm. Data are expressed as medians (interquartile 25; interquartile 75) (Kruskal–Wallis, $p>0.05$).

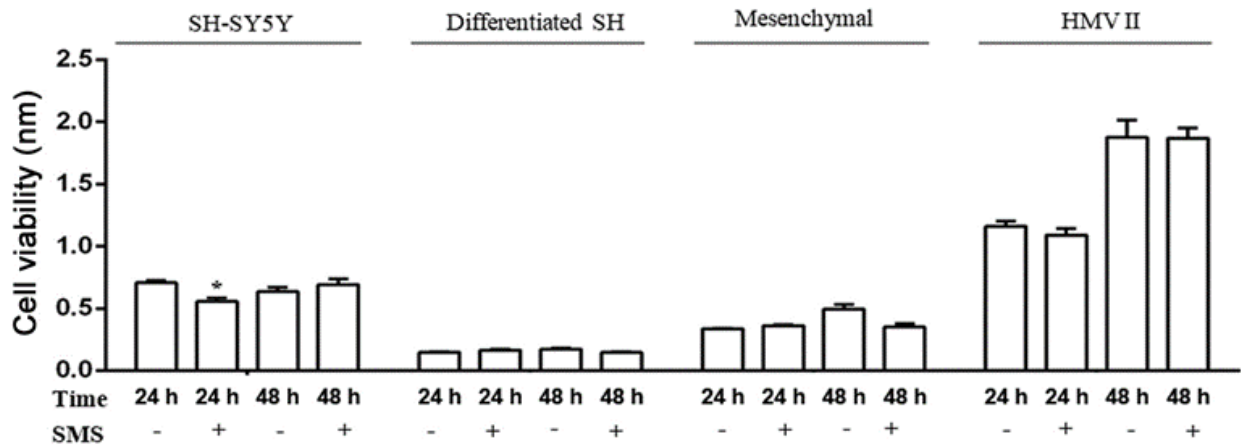


Figure 4. Cell viability of SH-SY5Y, differentiated SH-SY5Y, HMV II and MSCh cells exposed to 0.3 T (305 mT) SMS. MTT analysis was done immediately after SMS exposure (24 h) and 24 h after SMS exposure (48 h). Results are presented as nm. In the MSCh, SH Dif and SH groups, data are expressed as mean±SD. In the HMV II group, data are expressed as medians (interquartile 25; interquartile 75). *Indicates significant difference when compared to the 24 h (-SMS) group (Student's t-test, $p < 0.05$).

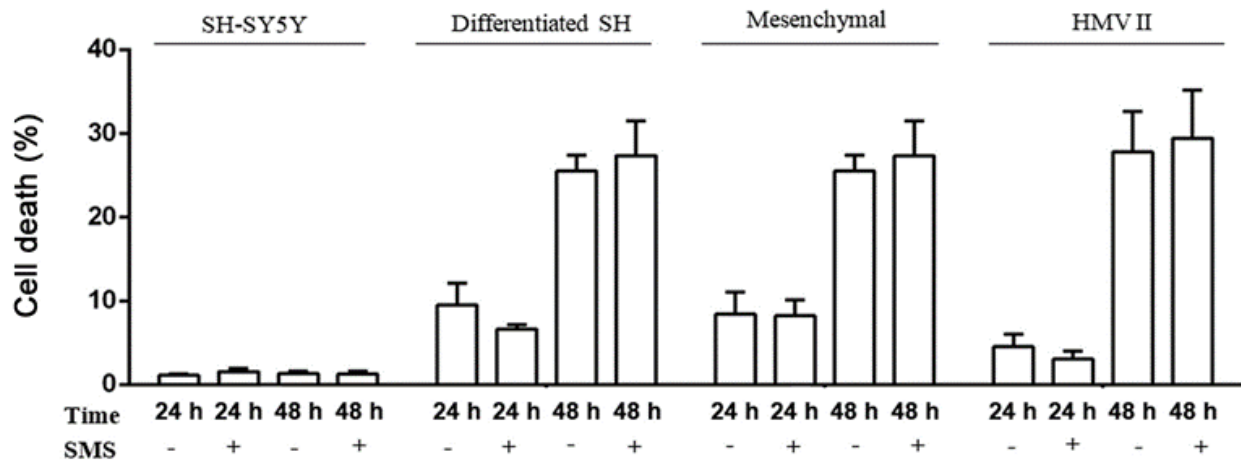


Figure 5. Cell death of SH-SY5Y, differentiated SH-SY5Y, HMV II and MSCh cells evaluated by PI/HO staining, immediately after SMS exposure (24 h) or 24 h after SMS exposure (48 h). Results are presented as percentages. In all groups, data are expressed as mean±SD. There was no difference between groups (Student's t-test, $p > 0.05$).

Cell cycle (PI staining). Cell cycle analysis (Figure 7) of SH-SY5Y cells showed no difference in the percentage of cells in sub-G1, G1, S, G2 and >4N phases in both periods analyzed (Student's t-test, $p > 0.05$), suggesting that exposure to SMS does not alter cell cycle distribution.

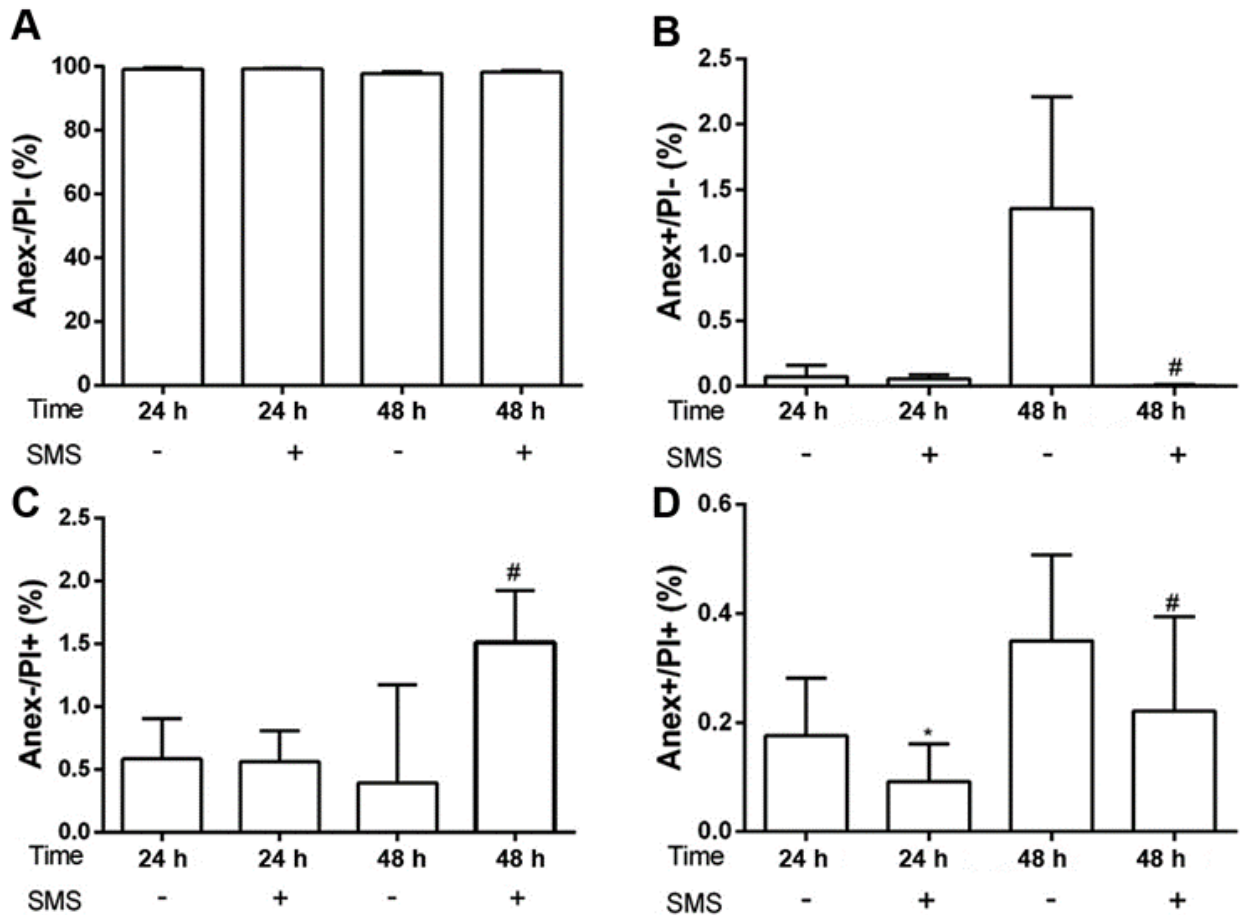


Figure 6. Cell death of SH-SY5Y cells evaluated by Annexin-V/PI staining, immediately after SMS exposure (24 h) or 24 h after SMS exposure (48 h). A) Live cells (Annex-/PI-). B) Apoptotic cells (Annex+/PI-). C) Necrotic cells (Annex-/PI+). D) Double-positive cells (Annex+/PI+). *Indicates significant difference when compared to the 24 h (-SMS) group (Kruskal–Wallis, $p < 0.05$). #Indicates significant difference when compared to the 48 h (-SMS) group (Student’s t-test, $p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SD/Data as expressed as median (interquartile 25; interquartile 75).

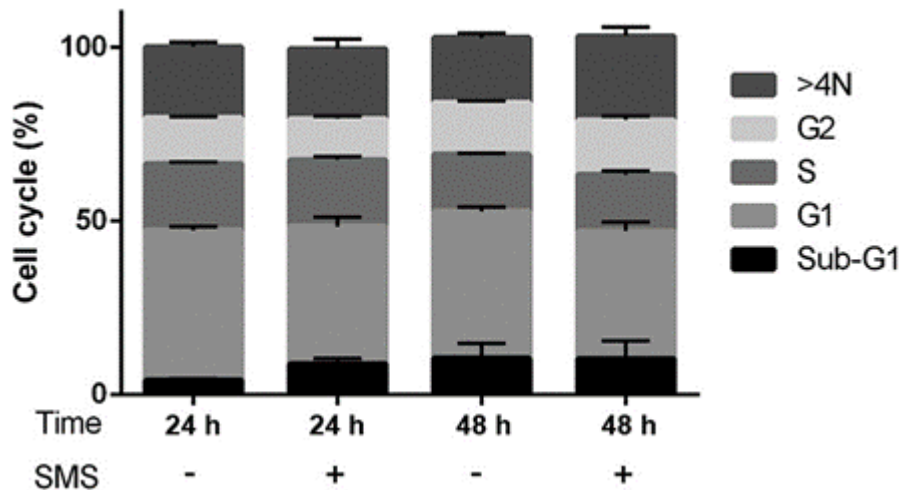


Figure 7. Cell cycle analysis of SH-SY5Y cells evaluated by PI staining, immediately after SMS exposure (24 h) or 24 h after SMS exposure (48 h). Results are presented as percentages. Data are expressed as mean±SD. There was no difference between the different times (Student's t-test, $p>0.05$).

BDNF expression. In SH-SY5Y cells, even though detection of BDNF was successful (Figure 8), there was no difference in cells exposed to SMS for both periods when compared to control groups (Kruskal–Wallis, $p>0.05$). Although there was no difference in BDNF expression between the stimulated cells and the control, there was a difference between the stimulated groups, which is expected, due to analysis in different periods.

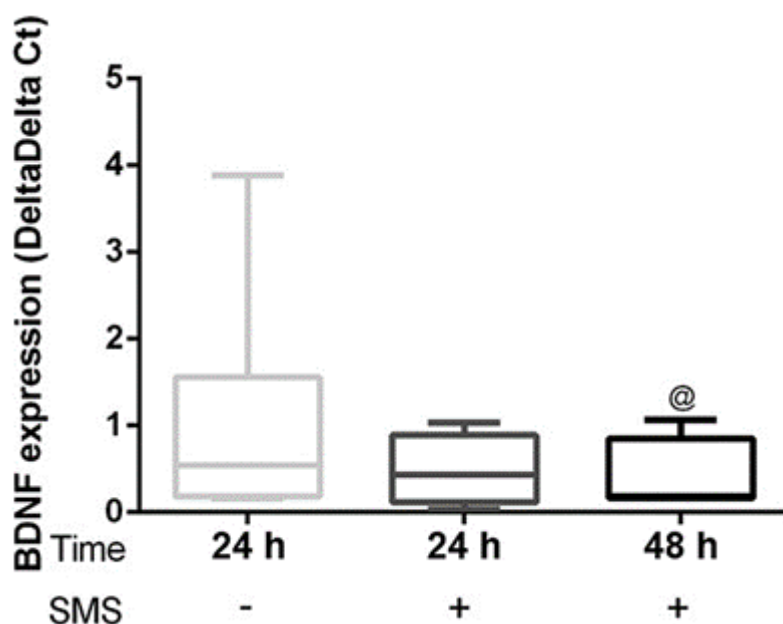


Figure 8. Gene expression analysis of BDNF gene in SH-SY5Y cells after SMS exposure (24 h) or 24 h after SMS exposure (48 h). Data are expressed as median (interquartile 25; interquartile

75). @Indicates significant difference between cells exposed to 24 h of SMS and cells exposed to 48 h of SMS (Kruskal–Wallis, $p < 0.05$).

DISCUSSION

Our results demonstrated that SH-SY5Y cells exposed to SMS for 24 h show a decrease in cell viability immediately after the exposure (24 h). A previous study using glioblastoma cells submitted to SMS for 24 h corroborates these findings regarding cell viability (15). This effect on cell viability, however, was not long-lasting, since 24 h after exposure treated groups were not different from the control group. SH-SY5Y cells did not show alterations in cell viability after exposure to magnetic stimulation, emphasizing that magnetic stimulation has cell type-dependent effects on cell viability.

PI/HO and Annexin-V/PI staining were performed in order to evaluate cell death. Evaluation of cell death 24 h after SMS exposure showed small differences compared to control cells (showing a decrease in apoptotic and double-positive cells, associated with an increase in necrotic cells). Alongside cell death, cell cycle profiling was performed, which indicated no changes in cell cycle distribution.

Our results indicated that SMS effects may also extend beyond the modulation of neuronal proliferation and plasticity. Neurotrophins, such as the brain-derived growth factor (BDNF), regulate the plasticity of the nervous system and are overexpressed in several types of cancer (27, 28). In fact, BDNF was initially characterized in oncogenic neuroblastoma, a type of cancer in nervous tissue (28). Even though the effects of SMS on nerve cells and brain tissues have been extensively described (23, 29-37), we found no difference in BDNF expression in SH-SY5Y cells exposed to SMS with the exception of an expected difference from 24 to 48 h.

When comparing our findings on undifferentiated and differentiated nerve cell lines only undifferentiated SH-SY5Y cells were influenced by SMS. Both SH-SY5Y cell subsets show differences ranging from polarization, number and length of the processes to proliferation (21, 38, 39), which may be distinctively affected by SMS. The difference in cell viability responses to SMS may not be due to the selectivity of action upon excitability (23) or other membrane channel-related effects (18, 40, 41), but may also influence other cellular processes. Indeed, SMS induces alterations in the viability of SH-SY5Y cells in response to cisplatin (24), having a modulatory effect on the cell's response to several pharmacological treatments, (42-47). Other effects of exposure to SMS have already been described in other cellular functions, such as ROS production (24), modulation of redox-related enzymes (25), pro- and anti-inflammatory

cytokine release (24) and improvement in the killing function of NK cell (17). Given the diversity of the processes affected by SMS, changes in cell viability probably involve processes in addition to cell death, cell cycle distribution and neurotrophin production. Future studies, using higher intensities, as well as a longer exposure times, are necessary to evaluate if this technique induces or inhibits cell death.

CONCLUSION

The different effects exerted by exposure to SMS provide valuable information regarding the application potential of SMS. This study demonstrated that, considering the analyzed parameters, SMS is a potentially safe technique, at least in the utilized protocol (0.3 T SMS/24 h). The decrease in SH-SY5Y cell viability also shows potential for treatment of neuronal tumors with SMS. Also, our results showed that the effect of SMS is cell type specific. It is important to note that this is one of the first studies showing SMS as a potential tool in the treatment of neuronal tumors. Further investigations in this area are still necessary to better understand the effects of SMS exposure on cultured cells and in vivo models.

Conflicts of Interest

The Authors have no conflicts of interest to declare regarding this study.

Authors' Contributions

HRM, FSOO, EOCL, PRSS, FF, WC and ILST were responsible for the study concept and design. HRM, JA, MS, LN, NAACH and CUC contributed to the acquisition of the data. HRM, JA, CUC, FSOO, EOCL and ILST were responsible by data analysis. HRM, LFM, JA and ILST drafted the manuscript. All Authors revised and edited the manuscript and approved the final version.

Acknowledgements

The Authors were supported by the Brazilian's agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Dra ILS Torres; Dr. W. Caumo, Dr. P. R. S. Sanches), Federal University of Rio Grande do Sul and Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education – CAPES (Helouise Medeiros). The Authors also want to thank the Engineering Division from the HCPA for having developed the SMS stimulator; the Graduate Research Group of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre – GPPG (I.L.S. Torres, grant number 15-0567); MCT/FINEP – COENG/2013. PRONEM FAPERGS. The Authors are also thankful for Research Incentive Fund received from FIPE/HCPA.

REFERENCES

- 1 Ziemann U: Thirty years of transcranial magnetic stimulation: where do we stand? *Exp Brain Res* 235(4): 973-984, 2017. PMID: 28120010. DOI: 10.1007/s00221-016-4865-4
- 2 Bergmann TO, Karabanov A, Hartwigsen G, Thielscher A and Siebner HR: Combining non-invasive transcranial brain stimulation with neuroimaging and electrophysiology: Current approaches and future perspectives. *NeuroImage* 140: 4-19, 2016. PMID: 26883069. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2016.02.012
- 3 Brittain J-S and Cagnan H: Recent trends in the use of electrical neuromodulation in Parkinson's disease. *Curr Behav Neurosci Rep* 5(2): 170-178, 2018. PMID: 29862163. DOI: 10.1007/s40473-018-0154-9
- 4 Hariz M: Deep brain stimulation: new techniques. *Parkinsonism Relat Disord* 20: S192-196, 2014. PMID: 24262179. DOI: 10.1016/S1353-8020(13)70045-2
- 5 Lefaucheur J-P, Antal A, Ayache SS, Benninger DH, Brunelin J, Cogiamanian F, Cotelli M, Ridder D, Ferrucci R, Langguth B, Marangolo P, Mylius V, Nitsche MA, Padberg F, Palm U, Poulet E, Priori A, Rossi S, Scheckmann M, Vanneste S, Ziemann U, Garcia-Larrea L and Paulus W: Evidence-based guidelines on the therapeutic use of transcranial direct current stimulation (tDCS). *Clin Neurophysiol* 128(1): 56-92, 2014. PMID: 27866120. DOI: 10.1016/j.clinph.2016.10.087
- 6 Martin DM, McClintock SM, Forster JJ, Lo TY and Loo CK: Cognitive enhancing effects of rTMS administered to the prefrontal cortex in patients with depression: A systematic review and meta-analysis of individual task effects. *Depress Anxiety* 34(11): 1029-1039, 2017. PMID: 28543994. DOI: 10.1002/da.22658
- 7 Blumberger DM, Vila-Rodriguez F, Thorpe KE, Feffer K, Noda Y, Giacobbe P, Knyahnytska Y, Kennedy SH, Lam RW, Daskalakis ZJ and Downar J: Effectiveness of theta burst versus high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation in patients with depression (THREE-D): a randomised non-inferiority trial. *Lancet Lond Engl* 391(10131): 1683-1692, 2018. PMID: 29726344. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30295-2
- 8 Kubis N: Non-invasive brain stimulation to enhance post-stroke recovery. *Front Neural Circuits* 10: 56, 2016. PMID: 27512367. DOI: 10.3389/fncir.2016.00056
- 9 Marron EM, Viejo-Sobera R, Quintana M, Redolar-Ripoll D, Rodríguez D and Garolera

- M: Transcranial magnetic stimulation intervention in Alzheimer's disease: a research proposal for a randomized controlled trial. *BMC Res Notes* 11(1): 648, 2018. PMID: 30185210. DOI: 10.1186/s13104-018-3757-z
- 10 Rutherford G, Lithgow B and Moussavi Z: Short and long-term effects of rTMS treatment on Alzheimer's disease at different stages: A pilot study. *J Exp Neurosci* 9: 43-51, 2015. PMID: 26064066. DOI: 10.4137/JEN.S24004
- 11 Galhardoni R, Correia GS, Araujo H, Yeng LT, Fernandes DT, Kaziyama HH, Marcolin MA, Bouhassira D, Teixeira MJ and Andrade DC: Repetitive transcranial magnetic stimulation in chronic pain: a review of the literature. *Arch Phys Med Rehabil* 96(4 Suppl): S156-172, 2015. PMID: 25437106. DOI: 10.1016/j.apmr.2014.11.010
- 12 Yılmaz B, Kesikburun S, Yaşar E and Tan AK: The effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on refractory neuropathic pain in spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 37(4): 397-400, 2014. PMID: 24621025. DOI: 10.1179/2045772313Y.0000000172
- 13 Hallett M: Transcranial magnetic stimulation: A Primer. *Neuron* 55(2): 187-199, 2007. PMID: 17640522. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.06.026
- 14 Ebrahimdamavandi S and Mobasheri H: Application of a static magnetic field as a complementary aid to healing in an in vitro wound model. *J Wound Care* 28(1): 40-52, 2019. PMID: 30625046. DOI: 10.12968/jowc.2019.28.1.40
- 15 Kim SC, Im W, Shim JY, Kim S-K and Kim BJ: Static magnetic field controls cell cycle in cultured human glioblastoma cells. *Cytotechnology* 68(6): 2745-2751, 2016. PMID: 27121019. DOI: 10.1007/s10616-016-9973-2
- 16 Jalali A, Zafari J, Jouni FJ, Abdolmaleki P, Shirazi FH and Khodayar MJ: Combination of static magnetic field and cisplatin in order to reduce drug resistance in cancer cell lines. *Int J Radiat Biol* 95(8): 1194-1201, 2019. PMID: 30822212. DOI: 10.1080/09553002.2019.1589012
- 17 Lin SL, Su YT, Feng S-W, Chang WJ, Fan KH and Huang HM: Enhancement of natural killer cell cytotoxicity by using static magnetic field to increase their viability. *Electromagn Biol Med* 38(2): 131142, 2019. PMID: 30889986. DOI: 10.1080/15368378.2019.1591439
- 18 Rosen AD: Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on

biological systems. *Cell Biochem Biophys* 39(2): 163-173, 2003. PMID: 14515021. DOI: 10.1385/CBB:39:2:163

19 Oliviero A, Mordillo-Mateos L, Arias P, Panyavin I, Foffani G and Aguilar J: Transcranial static magnetic field stimulation of the human motor cortex. *J Physiol* 589(Pt 20): 4949-4958, 2011. PMID: 21807616. DOI: 10.1113/jphysiol.2011.211953

20 Buemi M, Marino D, Pasquale GD, Floccari F, Senatore M, Aloisi C, Grasso F, Mondio G, Perillo P, Frisina N and Corica F: Cell proliferation/cell death balance in renal cell cultures after exposure to a static magnetic field. *Nephron* 87(3): 269-273, 2001. PMID: 11287763. DOI: 10.1159/000045925

21 Kovalevich J and Langford D: Considerations for the use of SH- SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1078: 9-21, 2013. PMID: 23975817. DOI: 10.1007/978-1-62703-640-5_2

22 Cheung YT, Lau WKW, Yu MS, Lai CSW, Yeung SC, So KF and Chang RCC: Effects of all-trans-retinoic acid on human SH- SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *NeuroToxicology* 30(1): 127-135, 2009. PMID: 19056420. DOI: 10.1016/j.neuro.2008.11.001

23 Klein RC, Goetz SM, Liedtke WB, Moore SD and Peterchev AV: Static magnetic field modulates excitatory activity in layer II/III pyramidal neurons of the rat motor cortex. *Sixth International IEEE/EMBS Conference on Neural Engineering (NER)*, pp. 1190-1193, 2013.

24 Vergallo C, Ahmadi M, Mobasheri H and Dini L: Impact of inhomogeneous static magnetic field (31.7-232.0 mT) exposure on human neuroblastoma SH-SY5Y cells during cisplatin administration. *PloS One* 9(11): e113530, 2014. PMID: 25423171. DOI: 10.1371/journal.pone.0113530

25 Shokrollahi S, Ghanati F, Sajedi RH and Sharifi M: Possible role of iron containing proteins in physiological responses of soybean to static magnetic field. *J Plant Physiol* 226: 163-171, 2018. PMID: 29778670. DOI: 10.1016/j.jplph.2018.04.018

25 Lim WC, Kim H, Kim YJ, Park SH, Song JH, Lee KH, Lee YH, So KA, Choi KC and Ko H: Delphinidin inhibits BDNF-induced migration and invasion in SKOV3 ovarian cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* 27(23): 5337-5343, 2017. PMID: 29122484. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.09.024

- 27 Garrido MP, Torres I, Vega M and Romero C: Angiogenesis in gynecological cancers: Role of Neurotrophins. *Front Oncol* 9: 913, 2019. PMID: 31608227. DOI: 10.3389/fonc.2019.00913
- 28 Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ and Brodeur GM: Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* 14: 759-767, 1994. PMID: 8264643. DOI: 10.1128/mcb.14.1.759
- 29 Silbert BI, Pevcic DD, Patterson HI, Windnagel KA and Thickbroom GW: Inverse correlation between resting motor threshold and corticomotor excitability after static magnetic stimulation of human motor cortex. *Brain Stimul* 6(5): 817-820, 2013. DOI: 10.1016/j.brs.2013.03.007
- 30 Kirimoto H, Asao A, Tamaki H and Onishi H: Non-invasive modulation of somatosensory evoked potentials by the application of static magnetic fields over the primary and supplementary motor cortices. *Sci Rep* 6: 34509, 2016. DOI: 10.1038/srep34509
- 31 Gonzalez-Rosa JJ, Soto-Leon V, Real P, Carrasco-Lopez C, Foffani G, Strange BA and Oliviero A: Static magnetic field stimulation over the visual cortex increases alpha oscillations and slows visual search in humans. *J Neurosci* 35(24): 9182-9193, 2015. PMID: 26085640. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4232-14.2015
- 32 Aguila J, Cudeiro J and Rivadulla C: Effects of static magnetic fields on the visual cortex: reversible visual deficits and reduction of neuronal activity. *Cereb Cortex* 26(2): 628-638, 2016. PMID: 25260705. DOI: 10.1093/cercor/bhu228
- 33 Kirimoto H, Tamaki H, Matsumoto T, Sugawara K, Suzuki M, Oyama M and Onishi H: Effect of transcranial static magnetic field stimulation over the sensorimotor cortex on somatosensory evoked potentials in humans. *Brain Stimul* 7(6): 836-840, 2014. PMID: 25444588. DOI: 10.1016/j.brs.2014.09.016
- 34 Carrasco-Lopez C, Soto-Leon V, Cespedes V, Profice P, Strange BA, Foffani G and Oliviero A: Static magnetic field stimulation over parietal cortex enhances somatosensory detection in humans. *J Neurosci* 37(14): 3840-3847, 2017. PMID: 28280254. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2123-16.2017
- 35 Li G, Cheng L, Qiao X and Lin L: Characteristics of delayed rectifier potassium

channels exposed to 3 mT static magnetic field. *IEEE Trans Magn* 46(7): 2635-2638, 2010. DOI: 10.1109/TMAG.2010.2045389

36 Giachello CNG, Scrutton NS, Jones AR and Baines RA: Magnetic fields modulate blue-light-dependent regulation of neuronal firing by cryptochrome. *J Neurosci* 36(42): 10742-10749, 2016. PMID: 27798129. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2140-16.2016

37 Shen JF, Chao YL and Du L: Effects of static magnetic fields on the voltage-gated potassium channel currents in trigeminal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 415(2): 164-168, 2007. PMID: 17289262. DOI: 10.1016/j.neulet.2007.01.015

38 Pählman S, Hoehner JC, Nånberg E, Hedborg F, Fagerström S, Gestblom C, Johansson I, Larsson U, Lavenius E, Ortoft E and Söderholm H: Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *Eur J Cancer* 31A(4): 453-458, 1995. DOI: 10.1016/0959-8049(95)00033-F

39 Gimenez-Cassina A, Lim F and Diaz-Nido J: Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. *J Neurosci Res* 84(4): 755-767, 2006. PMID: 16802347. DOI: 10.1002/jnr.20976

40 Balcavage WX, Alvager T, Swez J, Goff CW, Fox MT, Abdullyava S and King MW: A mechanism for action of extremely low frequency electromagnetic fields on biological systems. *Biochem Biophys Res Commun* 222: 374-8, 1996. PMID: 8670212. DOI: 10.1006/bbrc.1996.0751

41 St Pierre TG and Dobson J: Theoretical evaluation of cell membrane ion channel activation by applied magnetic fields. *Eur Biophys J* 29: 455-456, 2000. PMID: 11081406. DOI: 10.1007/s002490000090

42 Gray JR, Frith CH and Parker JD: In vivo enhancement of chemotherapy with static electric or magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 21: 575-583, 2000. DOI: 10.1002/1521-186X(200012)21:83.0.CO;2-F

43 Tofani S, Barone D, Berardelli M, Berno E, Cintorino M, LFoglia L, Ossola P, Ronchetto F, Toso E and Eandid M: Static and ELF magnetic fields enhance the in vivo anti-tumor efficacy of cis-platin against lewis lung carcinoma, but not of cyclophosphamide against B16 melanotic melanoma. *Pharmacol Res* 48: 83-90, 2003. PMID: 12770519. DOI: 10.1016/S1043-

6618(03)00062-8

44 Chen WF, Qi H, Sun RG, Liu Y, Zhang K and Liu J-Q: Static magnetic fields enhanced the potency of cisplatin on K562 cells. *Cancer Biother Radiopharm* 25: 401-408, 2010. PMID:

20707721. DOI: 10.1089/cbr.2009.0743

45 Hao Q, Wenfang C, Xia A, Qiang W, Ying L, Kun Z and Runguang S: Effects of a moderate-intensity static magnetic field and adriamycin on K562 cells. *Bioelectromagnetics* 32:

191-199, 2011. PMID: 21365663. DOI: 10.1002/bem.20625

46 Liu Y, Qi H, Sun RG and Chen WF: An investigation into the combined effect of static magnetic fields and different anticancer drugs on K562 cell membranes. *Tumori* 97: 386-392,

2011. PMID: 21789021. DOI: 10.1700/912.10039

47 Sun RG, Chen WF, Qi H, Zhang K, Bu T, Liu Y and Wang S-R: Biologic effects of SMF and paclitaxel on K562 human leukemia cells. *Gen Physiol Biophys* 31: 1-10, 2012. PMID:

22447825. DOI: 10.4149/gpb_2012_002

48 Vergallo C, Dini L, Szamosvölgyi Z, Tenuzzo BA, Carata E, Panzarini E and László JF: In vitro analysis of the anti-inflammatory effect of inhomogeneous static magnetic field-

exposure on human macrophages and lymphocytes. *PLoS One* 8(8): e72374, 2013. PMID:

23991101. DOI: 10.1371/journal.pone.0072374

8.2 ARTIGO 2

Submetido para publicação.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de um suporte adequado para EME, atingiu o objetivo de que todas as células recebam a mesma intensidade magnética. O suporte desenvolvido é prático e de fácil manuseio, muito diferente dos descritos na literatura.

O fato da EME alterar a viabilidade celular das células SH-SY5Y após a exposição de 24h, deve ser mais bem investigado, visto que foram encontradas poucas alterações. Já no grupo estimulado por 6 dias, encontramos diversos resultados que se complementam entre si, mostrando que o tempo de estimulação é um fator fundamental. Vimos que, quando analisadas as células HMVII, os mesmos resultados não foram encontrados, indicando que, utilizando os tempos e a intensidade escolhidos, o feito da EME é célula-específica, sendo necessário analisar outros tipos celulares para confirmar essa hipótese .

Por fim, este estudo contribuiu para o desenvolvimento de um modelo de Estimulação Magnética Estática *in vitro*, o que subsidiará a realização de outros estudos buscando um melhor entendimento dos efeitos e mecanismos de ação da EME em cultura celular.

10. PERSPECTIVAS FUTURAS

Após o desenvolvimento do suporte magnético estático definindo o tempo e intensidade proposto, iremos avaliar ciclinas, e ver sua interferência no ciclo celular, canais de cálcio, interleucinas e outros testes para entendermos ainda mais sobre essa técnica.

Em futuros estudos também buscaremos avaliar os efeitos da EME em longo prazo, e avaliar a resposta de outros tipos celulares à exposição da EME , como as células da glia e cultura primária de outros tipos celulares do SNC. Adicionalmente, pretendemos desenvolver experimentos *in vivo* por meio do implante de células tumorais em ratos..

A escassez de estudos relacionados à cultura celular frente às técnicas de EME demonstra a necessidade de estimular novos estudos que avaliem o funcionamento intrínseco destas técnicas, para que sejam utilizadas com segurança tanto em pesquisa clínica como no tratamento de doenças.

11. ANEXO



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

CARTA DE APROVAÇÃO

Projeto: 180026

Data da Versão do Projeto: 02/05/2018

Pesquisadores:

IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

ELIZABETH OBINO CIRNE LIMA

JOSÉ ANTONIO FAGUNDES ASSUMPCÃO

CARLA DE OLIVEIRA

HELOUISE RICHARDT MEDEIROS

PAULO ROBERTO STEFANI SANCHES

LICIANE FERNANDES MEDEIROS

Título: EFEITO DA ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA ESTÁTICA EM CULTURA CELULAR DE NEUROBLASTOMA E NEUROBLASTOMA DIFERENCIADO

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Profª. Patricia Ashton Prolla
Coordenadora GPPG/HCPA