

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
MESTRADO EM BIOFÍSICA

**ALBERTO MONTEIRO PEIXOTO**

**NFLUÊNCIA DO CAMPO MAGNÉTICO ESTÁTICO  
SOBRE O TECIDO SANGÜÍNEO DE  
CAMUNDONGOS (*Mus musculus*).**

RECIFE

2001

**ALBERTO MONTEIRO PEIXOTO**

INFLUÊNCIA DO CAMPO MAGNÉTICO  
ESTÁTICO SOBRE O TECIDO SANGÜÍNEO  
DE CAMUNDONGOS (*Mus musculus*).

Dissertação apresentada como parte  
dos requisito para a obtenção do  
grau de Mestre no Curso de pós-  
graduação em Biofísica, Centro de  
Ciências Biológicas, Universidade  
Federal de Pernambuco.  
Orientador: Prof. Mauricy Alves da  
Motta

RECIFE

2001

*Se alguém não sabe e sabe que não sabe, é humilde, guie-o;  
Se alguém não sabe e pensa que sabe, é um tolo, afaste-se dele;  
Se alguém sabe e pensa que não sabe, está dormindo, acorde-o;  
Se alguém sabe e sabe que sabe, é um mestre, siga-o*

(Provérbio Chines)

A **Deus** por me dar um grau de inteligência e de consciência tão altos que a mim, não me resta dúvidas ao concluir: **Deus** é o criador do universo.

Aos meus pais **Antônio Brasiliano Peixoto** e **Rubenita da Paz Monteiro Peixoto** pela oportunidade que eles me deram de nascer, crescer num ambiente exemplar, de estudar e de sentirem orgulho de mim. Nenhuma palavra vai descrever o que eu sinto por vocês, porque eu sinto amor, orgulho...

À minha esposa **Divaneide da Silva Oliveira** que foi e continua sendo muito especial para mim.

Ao meu filhinho **Guilherme O. Monteiro Peixoto** que trouxe para mim uma sensação de prazer pela vida ainda maior do que eu já sentia.

Aos meus irmãos.

OFEREÇO.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. **Mauricy Alves da Motta** que aceitou me ensinar o caminho de uma pós graduação.

À CAPES pelo apoio financeiro

Ao meu amigo Prof. Dr. **Milton Marcelino** pelas muitas orientações que me deu em relação à dissertação e a outras atividades acadêmicas.

À Prof<sup>ª</sup>. **Tereza Jansen** que também foi muito importante tanto pelas cobranças quanto pelas várias contribuições em relação à dissertação.

À Dra. **Norma M. A. Marcelino** e à Dra **Maria Bernadete M de Carvalho** que me ajudaram em parte do experimento, através do Setor de Hematologia do Hospital das Clínicas da – UFPE, e à Profa. Dra **Ana Mendonça** que me ajudou na aquisição dos dados da eletroforese.

Ao prof. Dr. **Ascendino Silva** (DEES/UFPE) pela valiosa colaboração à dissertação, ao ceder o software DATA-GEL para análise das eletroforeses.

A oportunidade de poder conhecer e fazer excelentes amizades com meus colegas de mestrado (entre eles: **Marcílio André F. Feitosa, MSc.** que contribuiu com valiosas idéias na dissertação; **José Álvaro** e **Eduardo Montenegro**), com vários professores do departamento de Biofísica e com outros funcionários.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram com a minha formação acadêmica e que possibilitaram o desenvolvimento desta dissertação.

# ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 - INTRODUÇÃO	11
1.1 - Breve histórico sobre campo eletromagnético	11
1.2 - Aplicações do Campo Magnético	14
1.3 - Efeitos do campo magnético sobre o tecido sanguíneo.	16
2 - OBJETIVO	20
2.1 - Geral	20
2.2 - Específico	20
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 - Modelo experimental	21
3.2 - Os Animais	22
3.3 - Gerador do Campo Magnético	23
3.4 - Caixa de exposição dos animais	26
3.5 - Procedimento para pesagem dos animais	27
3.6 - Procedimentos para coleta de sangue	27
3.7 - Hemograma e Eletroforese	29
3.8 - Exposição ao Campo Magnético Estático (CME)	32
3.9 - Processamento dos dados eletroforéticos	35
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 - Peso médio dos animais	37
4.2 - Eletroforese do plasma	40
4.3 - Resultados obtidos pelo analisador hematológico Coulter	46
4.4 - Resultados obtidos pelo exame histológico dos esfregaços.	48
5 - CONCLUSÃO	49
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
7 - ANEXO	54
7.1 - ANEXO 1	55
7.2 - ANEXO 2	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CME:</b>	Campo magnético estático
<b>Gap:</b>	Compartimento; espaço
<b>Hct:</b>	Hemoglobina Corpuscular Total
<b>Hgb:</b>	Hemoglobina
<b>KDa:</b>	Kilodaltons
<b>Lymph #:</b>	Linfócitos dado em número
<b>Lymph %:</b>	Linfócitos dado em percentual
<b>MCH:</b>	Hemoglobina Corpuscular Média
<b>MCHC:</b>	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
<b>MCV:</b>	Volume Corpuscular Médio
<b>mT:</b>	mili-Tesla, unidade de densidade de fluxo magnético utilizado no sistema (mksa)
<b>Oe:</b>	Oersted, unidade de intensidade de fluxo magnético no sistema (cgs)
<b>RBC:</b>	Células vermelhas do sangue
<b>WBC:</b>	Células brancas do sangue

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Etapas da hematopoiese no embrião e no feto	18
<b>Figura 2.</b> Gerador de campo magnético GEOTRONIC (117mT)	24
<b>Figura 3.</b> Fotografia aproximada do “gap”	24
<b>Figura 4.</b> Regulador de tensão	25
<b>Figura 5.</b> Compartimento utilizado para expor os animais ao CME	26
<b>Figura 6.</b> Visão frontal do equipamento <i>Coulter</i>	30
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática do sistema seqüencial das corridas das amostras no gel de poliacrilamida	31
<b>Figura 8.</b> Esquema geral de exposição dos camundongos ao CME	32
<b>Figura 9.</b> Crescimento percentual semanal dos camundongos	38
<b>Figura 10.</b> Eletroforese do plasma dos animais controle e experimentais	40
<b>Figura 11.</b> Eletroforese com representação dos três grupos e o padrão	41
<b>Figura 12.</b> Representação gráfica da eletroforese para o grupo exposto 1h	42
<b>Figura 13.</b> Representação gráfica da eletroforese para o grupo exposto 2h	42
<b>Figura 14.</b> Representação dos valores dos elementos figurados do sangue	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Período de duração da exposição dos camundongos	33
<b>Tabela 2.</b>	Período de exposição diária dos camundongos ao CME	34
<b>Tabela 3.</b>	Variação semanal do peso dos animais	37
<b>Tabela 4.</b>	Variação percentual do peso dos grupos de animais	38

## RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo principal, investigar a influência da indução do campo magnético estático no sangue. Foram observados um total de noventa camundongos divididos em três grupos: um com trinta animais como controle; um segundo com trinta animais expostos a um campo magnético de 117mT durante 1 hora/dia e um terceiro com trinta animais expostos a um campo de mesma intensidade e durante 2 horas/dia. Após trinta dias de exposição diária, todos os animais tiveram amostras de seus sangues avaliadas para verificar a morfologia das células através de esfregaço de lâmina; contagem dos vários tipos celulares do sangue e conteúdo de hemoglobina, além da avaliação quantitativa das proteínas encontradas no plasma através de eletroforese em gel. Houve também uma avaliação semanal do peso dos animais. Os resultados da avaliação entre o grupo controle e os dois grupos expostos ao campo, não mostraram nenhuma alteração significativa entre os grupos. Os dados hematológicos obtidos mostraram uma relação direta do campo magnético com o número de linfócitos, que teve um aumento de 6.8% no grupo exposto 1 hora/dia e um aumento de 7.74% no grupo exposto 2 horas/dia. Esta diferença foi significativa para um  $p = 0.034$ . O exame do esfregaço sob microscopia óptica não revelou nenhuma alteração morfológica nas células do sangue. A eletroforese do plasma em gel, mostrou alteração da concentração de duas bandas; uma cujo peso equivale ao de uma proteína de peso molecular de 45 Kda, esta banda apresentou-se menos intensa com a ação do campo magnético. A outra banda, apresentou um peso equivalente ao de uma proteína de peso molecular de 97 Kda, esta banda apresentou-se mais intensa com a exposição ao campo magnético. Novos estudos direcionados a estas proteínas que mostraram ser sensíveis ao campo magnético podem ser muito importantes para esclarecer possíveis alterações fisiopatológicas provocadas pelo campo magnético estático.

## ABSTRACT

The present work had as its principal aim to investigate the influence induced by a static magnetic field on the blood. This study was carried on ninety mice divided in three groups: one of thirty as a control, the second of thirty was exposed to a static magnetic field of 117mT for 1 hour/day, and the third group of thirty for 2 hours/day. After thirty days of daily exposure, all the animals had their blood samples evaluated for morphological changes by a fresh blood smear, for blood count and hemoglobin content using a Coulter counter and for plasma protein changes by carrying out gel electrophoresis. A weekly follow up was also carried out on the weight of the animals. The result of this follow up between the control and the exposed group of animals did not show any significant changes. The hematological data which was obtained shows a direct relationship between the static magnetic field exposure and the number of lymphocytes, which had an increase of 6.8 % for the group exposed for 1 h/day and an increase of 7.74 % in the group exposed for 2 h/day. This difference was significant for  $p= 0.034$ . The smear examination under a light microscope did not show any morphological changes on the blood cells. The gel eletrophoresis showed changes in two plasma proteins: one in the band equivalent to the molecular weight corresponding to 45 kDa, the intensity was noted to be reduced by the action of the static magnetic field when compared to control; the other was in the protein with a molecular weight corresponding to 97 kDa which showed an increase after subjecting to the static magnetic field. Further studies on these proteins which showed to be sensitive to the magnetic field would be interesting and to correlate these changes to physiopathological findings.

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - Breve histórico sobre campo eletromagnético

Há cerca de 4000 A.C. foi escrito o primeiro registro sobre eventos biológicos causados por eletricidade, quando se observou que um peixe conhecido como *catfish* (*Corydoras trilineatus*) que tem sua origem nas regiões amazônicas do Peru PLANETCATFISH (2001), possuía a capacidade de produzir um choque elétrico de mais de 450 volts de amplitude (MORGAN, apud MALMIVUO; PLONSEY 1995). No ano 46 D.C. foi escrito o primeiro documento relatando o uso da eletricidade na medicina, que recomendava a aplicação do choque do peixe elétrico como um meio de cura para a dor de cabeça e gota. Estes foram os marcos iniciais do uso de fenômenos elétricos em saúde. Foi só a partir do início de 1.700 D.C. que iniciou-se uma aplicação sistemática da eletricidade para uso terapêutico. O conhecimento dos fenômenos magnéticos é também tão antigo quanto os elétricos, no entanto durante muitos anos os estudos sobre magnetismo limitaram-se aos ímãs. Até 1819 não se conhecia nenhuma ligação entre estes dois fenômenos e foi neste ano que o físico dinamarquês Hans Christian Oersted (1770-1851) descobriu que existia uma relação entre corrente elétrica e o campo magnético, quando observou uma agulha imantada de bússola desviando-se quando colocado próxima a um fio eletrizado com corrente contínua. Em 1831, o cientista inglês Michael Faraday descobriu que campos magnéticos em movimento induziam correntes elétrica em fios condutores próximos, e apresentou a teoria eletromagnética que une os fenômenos elétricos e magnéticos e previu a existência de ondas eletromagnéticas, como a luz e ondas de radio.

*Franz A. Mesmer* (1734-1815), médico vienense, lançou a teoria que postulava a existência, nos seres vivos, de vários “fluidos magnéticos” que provinham do próprio organismo e que poderiam ser influenciados por campos magnéticos externos. Fundamentado em sua própria teoria, *Mesmer* anunciou a cura de algumas doenças mediante o uso de ímãs, no entanto, pouco tempo depois foi desacreditado e considerado um charlatão .Na época atual, alguns

experimentos recentes demonstraram que as teorias de *Mesmer* não estavam erradas, mas a cura ainda não pode-se afirmar que ocorre com a influência de campos magnéticos.

Existem vários equipamentos médicos que, embora não sejam usados como recursos terapêuticos, são utilizados para diagnóstico e para isso utilizam os campos magnéticos gerados pelos organismos. Entre eles podemos citar o magnetocardiógrafo (MCG), que registra os sinais magnéticos provenientes da atividade elétrica do coração e o magnetoencefalógrafo (MEG), que registra os sinais magnéticos provenientes da atividade elétrica do cérebro, entre outros.

Nos anos de 1960, houve um grande interesse da comunidade científica em sistematizar os estudos sobre campos magnéticos, e foi nesta década que houve o maior número de publicações sobre a influência do campo magnético estático sobre os seres vivos (WAGIH, 1981) Como resultado destes estudos, algumas tabelas foram publicadas, mostrando os efeitos causados pelos campos magnéticos estáticos sobre vários seres vivos, levando em consideração a intensidade e o tempo de exposição ao campo magnético.

FEYCHTING e AHLBOM (1993) realizaram um extenso trabalho na Suécia entre os anos de 1960 e 1985, que pesquisava a influência dos campos magnéticos gerados por linhas de força de alta tensão sobre crianças vivendo em residências localizadas sob estas linhas. Como resultado, encontrou-se que existe um alto índice de câncer (principalmente em linfócitos) entre estas crianças estudadas. Estes resultados também foram encontrados por SAVITZ (1988)

A partir de então, se tem procurado encontrar qual o mecanismo de ação dos campos magnéticos que promove os efeitos observados, levantando conseqüentemente uma questão: existiria um receptor específico para o campo magnético, nos sistemas vivos?

Os campos do conhecimento que estudam a interação entre campos magnéticos e biologia foram chamados inicialmente de magnetobiologia, referindo-se às alterações induzidas nos meios biológicos e de biomagnetologia, o estudo dos campos magnéticos gerados pelos seres vivos. Atualmente se usa o termo bioeletromagnetismo para englobar os dois sentidos explicitados acima.

Existem algumas teorias que tentam explicar o que ocorre para que o campo provoque os efeitos observados nos seres vivos, entre elas podemos citar duas:

I) MARKOV (1981), defende que os efeitos causados pelos campos magnéticos sobre o organismo, é um efeito indireto, já que ele age sobre a água. O autor atribui este fato ao alto conteúdo de água em células e tecidos, sugerindo que apenas através da água os campos externos podem influenciar o estado funcional do organismo vivo. Suas explicações para tal fato baseiam-se no fato de que o campo muda algumas propriedades da água, o que ainda não está claro. O autor acredita que o campo magnético é capaz de influenciar a microestrutura da água e os canais de hidratação e assim mudar o curso de alguns processos biológicos extremamente importantes.

II) BARNES (1990), defende que o mecanismo de ação deve-se ao fato de que o campo magnético tem a capacidade de gerar um fluxo de corrente elétrica em um condutor se este estiver sendo submetido ao campo. Esta corrente é que seria a responsável pelas conseqüências do campo se um organismo fosse exposto a este.

Aparentemente estas teorias têm explicações bem convincentes e tanto MARKOV (1981) quanto BARNES (1990) podem estar corretos em suas teorias, apesar de vários fenômenos observados em outros experimentos não terem sido explicados por elas. SUDA (1994); SHIGA (1993) e FRANK et al (1979), por exemplo, observaram uma orientação magnética tanto das células vermelhas do sangue quanto a do seu “ghost” (membrana das células), quando expostos a campos superiores a 1 Tesla. Como explicar esta ação com estas teorias, sabendo-se inclusive que nenhum componente da membrana celular é classificado como ferromagnético ou paramagnético?

BARNES (1990) utiliza uma das equações de *Maxwell* para explicar o surgimento da corrente elétrica em um corpo exposto ao campo magnético, mas se o campo magnético for estático, como explicar o mecanismo de ação do campo se em campos estáticos, segundo a equação, não há indução de corrente no condutor?

O que sabemos na realidade é que a influência do campo magnético no organismo vai depender tanto da intensidade do campo, quanto da freqüência

com a qual ele varia, e do tempo de exposição, ou seja, o efeito obtido com um campo de 60Hz pode não ser encontrado com um campo de 50Hz, o mais, continua sendo objeto de estudo.

## **1.2 - Aplicações do Campo Magnético**

Atualmente, os campos eletromagnéticos estão se tornando cada vez mais importantes, não só pelo fato de que existe um crescente aumento do número de equipamentos elétricos e eletrônicos que utilizam as radiações eletromagnéticas as quais estão cada vez mais presentes em nosso meio, mas também, a comunidade científica tem mostrado grande interesse no "mapeamento magnético" de órgãos, já que com o avanço da tecnologia se conseguiu detectar que cada órgão tem em torno de si, um campo magnético característico.

Para melhor identificar algumas destas aplicações, citamos como exemplo, alguns sinais obtidos do organismo humano e um método de obtenção, citados em MALMIVUO; PLONSEY (1995); ARAÚJO (1999) e BRONZINO (1995):

1. Magnetoencefalograma (MEG), estes sinais são gerados devido a atividade elétrica cerebral, que por ser de intensidade muito pequena, só podem ser captadas pelo uso do SQUID (superconducting quantum interference devices) que atualmente são os detectores de fluxo magnético mais sensíveis.
2. Estimulação magnética transcraniana (TMS), é um método de estimulação do tecido excitável com uma corrente elétrica induzida por um campo magnético externo. O resultado da avaliação é obtido pela análise das conseqüências deste estímulo.
3. Magnetoretinograma (MRG), sinais obtido pela aplicação de pulsos magnéticos sobre o olho. Estes sinais geradas pelos cones e bastonetes são analisados através de receptores colocados sobre a esclerótica e a pele;

4. Magnetocardiograma (MCG), sendo o primeiro sinal biomagnético a ser detectado (realizado por *Baule e McFee*), é bastante semelhante funcionalmente ao já conhecido eletrocardiograma (ECG), que está associado à atividade elétrica do coração. Em contraste com o ECG, o MCG relaciona-se ao campo magnético associado com as correntes elétricas do coração.

Existem muitos outros exames que surgiram depois da possibilidade de se detectar campos magnéticos pequenos. Estes campos são tão pequenos que segundo ARAÚJO (1999) encontram-se entre  $10^{-9}$  e  $10^{-15}$ T. No artigo escrito por este pesquisador, ele fala que "detectar um campo desta amplitude é como olhar para o céu a olho nu em um dia ensolarado e conseguir ver uma estrela".

São estes avanços tecnológicos que suscitam nosso interesse a seguir as pesquisas neste campo do bioeletromagnetismo. Pode-se ainda constatar grandes avanços em relação aos geradores de campos magnéticos que pularam de 1 ou 2 Tesla naqueles geradores feitos com enrolamentos de fios de cobre em núcleos de ferro nos anos 60, para até 45 Tesla em geradores feitos com materiais semicondutores refrigerados a baixíssimas temperaturas com Hélio e Nitrogênio, como aquele em uso no National High Magnetic Fields Laboratory, em Tallahassee, Florida, USA

Poderia ser questionada a razão de estudos biológicos em intensidade de fluxo tão altas. Realmente não há em nosso meio fontes de campos nessa amplitude, mas não podemos esquecer que uma pequena parte da população que trabalha em usinas hidrelétricas e outras fontes de energia cujos campos são também muito altos. Ainda, como vem sendo observado, os efeitos dos campos variam muito, tanto quanto à frequência, quanto com à intensidade. Sendo assim, o fato de existir a possibilidade de conseguir efeitos biológicos benéficos com campos de alta intensidade, justifica as pesquisas com estes valores.

### 1.3 - Efeitos do campo magnético sobre o tecido sanguíneo.

FEYCHTING e AHLBOM., (1993), mostraram que existe uma incidência significativa de câncer nas pessoas que moram próximos a linhas de forças de alta tensão, estando conseqüentemente sofrendo a ação do campo magnético induzido sendo que este acometimento ocorreu principalmente sobre o tecido sangüíneo na forma de leucemia, representando 27% dos indivíduos afetados.

O número de células sangüíneas, permanece constante em indivíduos saudáveis. Esta manutenção das concentrações de células ocorre mesmo após fenômenos de perda, como as hemorragias. Além deste fato, também é surpreendente que, sob situações como infecções, ocorram aumentos de concentração de uma ou mais populações celulares do sangue circulante.

Todos estes fenômenos ocorrem graças a tecidos especializados na produção de células sangüíneas, os tecidos hematopoiéticos.

Há diversos órgãos ricos em tecido hematopoiético. Nos mamíferos podemos citar:

- Medula óssea
- Baço
- Gânglios linfáticos
- Timo

Existem ainda regiões, como a parede do tubo digestivo, onde ocorre uma ativa formação de elementos do sangue.

Sabemos que existem vários fatores que podem alterar a constituição deste tecido quantitativamente WILLIAMS et al (1976):

- *Eritropoietina* (EPO), a síntese desta substância está relacionada aos rins e ao fígado e sua ação está ligada à hipóxia dos tecidos
- *Fator Estimulante de Colônias de granulócitos* (FEC-G), este fator estimula a granulopoiese, aumenta a atividade quimiotáxica, fagocitária e citotóxica dos neutrófilos e monócitos.

- *Fator Estimulante de colônias de granulócitos/monócitos (FEC-GM)*, estimula a formação de neutrófilos e monócitos

Existem duas etapas bem distintas para o tecido sangüíneo durante toda sua vida: a hematopoiese, com células jovens, e a fase adulta da célula.

*Hematopoiese:* Esta é a fase da formação do tecido sangüíneo que está relacionada a origem e ao desenvolvimento das células. Sabe-se que tanto as células vermelhas quanto as brancas e as plaquetas, têm origem na medula de todos os ossos, permanecendo apenas nos ossos chatos e longos no indivíduo adulto. Na vida intra-uterina, a hematopoiese é encontrada no saco vitelino. Posteriormente ocorre a formação de tecido hematopoiético no fígado e no baço, sendo que após o nascimento a medula dos ossos assumem total controle deste fenômeno Fig.1. Nesta fase existem vários fatores que podem alterar este tecido

- a) *As células jovens:* A eritropoiese se desenvolve a partir dos eritroblastos ou células mãe, dando origem às formas jovens de hemácias que ainda têm núcleos: os reticulócitos. A série branca também tem células mãe, de acordo com o seu tipo: linfoblastos do tipo T e B, Mieloblastos, que se diferenciam em basófilos, eosinófilos e neutrófilos. Os megacarioblastos dão origem aos megacariócitos e por fim às plaquetas.
- b) *A fase adulta da célula:* aquela fase em que a célula já está especializada ou diferenciada. Sabemos que as hemácias apresentam uma vida média em torno de 120 dias, sendo fagocitada pelo baço ao término deste período. Também a série branca se diferencia ao longo de seu processo de maturação, através da segmentação do núcleo e por granulações citoplasmáticas.

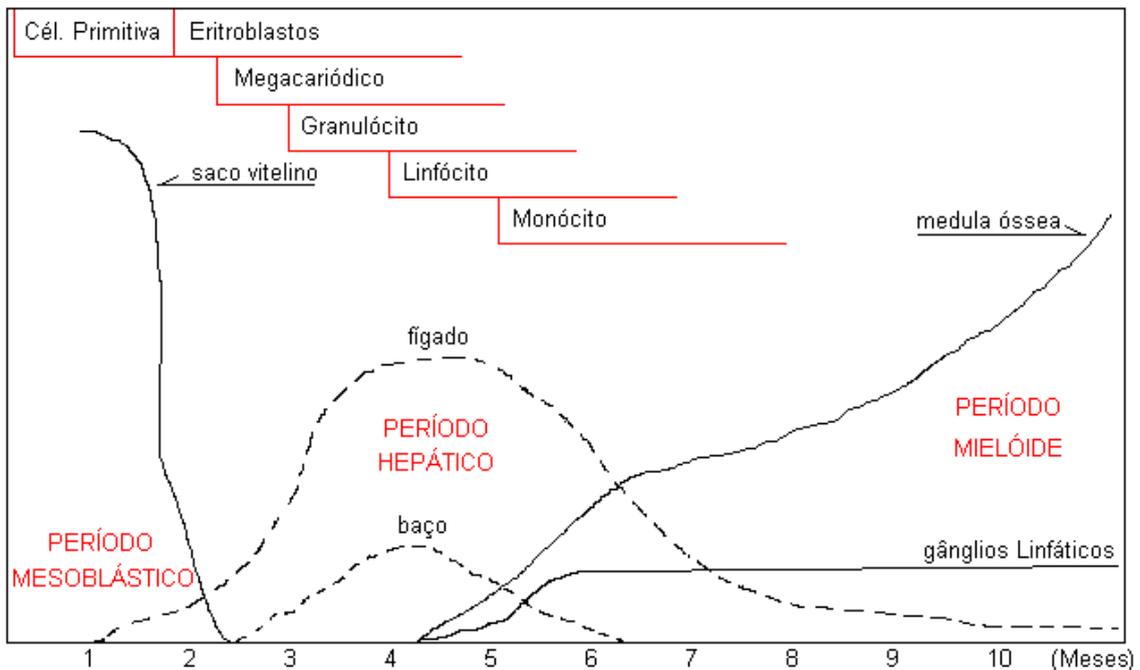


Figura 1. Etapas da hematopoiese no embrião e no feto, que indicam a participação comparativa dos principais centros hematopoiéticos e o momento aproximado do aparecimento dos vários tipos de células. Modificado de WINTROBE (1979).

Na fase em que a célula está se formando e se diferenciando (na hematopoiese), sabemos que existe uma intensa atividade metabólica e pode haver neste estágio da vida da célula uma influência do campo magnético atuando nas reações bioquímicas que estão ocorrendo, apesar de haver ainda pouco volume de trabalhos nesta área.

Além de transportar células da defesa orgânica e carreadoras de gases, o sangue também transporta a água usada pelo organismo, o calor gerado pelo metabolismo e as diversas substâncias produzidas pelas células, tais como proteínas, hormônios, enzimas, lipídios, glicídeos e todas as demais que fazem parte da bioquímica celular.

LIKHACHEV apud BARNOTHY (1969) demonstrou que campos estáticos de 0,5 T induzem o aumento de leucócitos em coelhos sofrendo de inflamação crônica além de fazerem aumentar o nível de eritrosedimentação. Isto leva a supor uma alteração nos processos de produção e amadurecimento da série branca, certamente orquestrado por fatores intrínsecos do sangue, tais como proteínas e enzimas. Estas últimas são sensíveis aos campos magnéticos, como atesta BLANK; SOO (1993).

FIORINI et al (1997), apresentou um estudo "*in vitro*" sobre a ação do campo magnético de 50 Hz e 0.5 mT sobre células vermelhas de coelho, demonstrando que, em células saudáveis, não se observou nenhum efeito. No entanto, quando estas células foram previamente estressadas com um oxidante (Fe[II]/ascorbato), os danos deste oxidante aumentaram. Assim também, GALVANOVSIS et al (1999) usando um campo com mesma frequência, encontrou alterações no nível de  $Ca^{++}$  no citoplasma de células T

A hemoglobina, ferro-proteína do sangue, é muito sensível aos campos magnéticos, devido à sua reatividade ferromagnética, causada pela indução magnética do *heme*, a estrutura molecular principal de cada uma das quatro sub estruturas da hemoglobina. O efeito direto de campos estáticos de média intensidade (350 e 400 mT) levam à modificação da conformação da hemoglobina, acompanhada de alterações nas interações intermoleculares ATEF (1995). Os campos de alta intensidade (10 a 50 T), por outro lado, provocam alinhamento das moléculas e as modificações estruturais induzidas levam à variação da absorbância de luz visível, sendo a oxi-hemoglobina menos sensível que a deoxihemoglobina, que apresenta maior paramagnetismo, MOTTA (1998); MELVILLE (1982) e MASAACKI (1997)

## **2 - OBJETIVO**

### **2.1 - Geral**

Avaliar a influência do campo magnético sobre o tecido sangüíneo de camundongos (*Mus musculus*)

### **2.2 - Específico**

- 1) Avaliar o crescimento dos animais quando expostos ou não ao CME;
- 2) Avaliar quantitativamente os elementos figurados do sangue.
- 3) Observar alterações morfológicas na série branca e vermelha do sangue, induzida pelo campo magnético estático.
- 4) Determinar o comportamento das proteínas presentes no plasma dos animais, expostos ou não, e comparar os resultados obtidos

## 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 - Modelo experimental

Comparando os seguintes tecidos: sangue, músculo, cérebro, e pulmão após serem expostos ao campos eletromagnéticos, WEBSTER (1976) relata que em relação à permissividade e a condutividade, o tecido mais afetado, ou seja o que apresenta maior valor, é o tecido sangüíneo. Estas duas propriedades dielétricas dos tecidos também é comentada por POLK (1995) Segundo MARKOV (1981), os efeitos do campo magnético ocorre principalmente devido à presença da água; o nosso tecido sangüíneo tem 90% só de água em sua composição plasmática

Além do mais, o tecido sangüíneo tem se mostrado como aquele que mais apresenta conseqüências graves (como o câncer) após exposição ao campo magnético FEYCHTING; AHLBOM (1993) e DUGGAR (1936).

Independente do tempo de exposição de um tecido ao campo magnético, provavelmente haverá alguma conseqüência sobre este. No entanto, MARKOV (1981), que realizou uma exposição da água ao campo magnético em tempos que variaram de 5 min a 120 min, com intervalos de 5 min, demonstra que o maior efeito do campo magnético sobre a água, encontra-se em um tempo de exposição de 30 min.

WAGIH (1981) fez um estudo sobre o efeito do campo magnético de 60Hz em ratos, com uma intensidade de 110 mT.

SEZE (2000) estudou o efeito de um campo magnético de 0.8 Hz de 100 mT sobre tumores induzidos quimicamente em ratos

Nossa fonte geradora do campo magnético pode emitir um campo de 117 mT. Como este valor encontra-se próximo dos valores citados, e só dispúnhamos dele, resolvemos utilizá-lo

### 3.2 - Os Animais

Foram utilizados 90 camundongos da espécie (*Mus musculus*), adquiridos no biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE. Os camundongos eram todos machos, com peso médio de 21.19 gramas, tendo sido desmamados aos 20 dias de idade.

A vistoria diária da água e da comida foi realizada para proporcionar aos camundongos uma alimentação abundante com ração balanceada específica (Labina) e água potável “ad libitum”.

Os animais foram tratados seguindo os procedimentos normais, ou seja, com troca de gaiolas a cada 3 dias, para manter as condições sanitárias exigidas, além de ambiente ventilado e iluminado com luz natural.

### 3.3 - Gerador do Campo Magnético

O gerador de campo magnético usado, é um eletroímã fabricado sob encomenda pela GEOTRONIC, atualmente MACTRÔNIC<sup>1</sup>, cuja fotografia pode ser vista na figura 2 e as características logo adiante. É formado por um núcleo de ferro em laminas mantidas juntas por uma armação de madeira, formando um quadrado. O núcleo tem a forma de um C, tendo portanto uma abertura (gap) de 10.5 cm, entre dois segmentos de 30,25 cm, que são paralelos a um braço, ou segmento inferior com 70 cm. Os lados do núcleo são formados por dois segmentos de 70 cm, fixados perpendicularmente nas extremidades dos segmentos descritos. O conjunto, mantidos por parafusos que atravessam a armação de madeira, pode girar em torno de um eixo montado com rolamentos no centro de duas barras de madeira que seguram todo o conjunto. As duas bobinas, com 50 quilogramas de fio 17 AWG cada uma, foram enrolada em torno dos segmentos laterais à abertura ou gap e podem ser basculadas para qualquer ângulo. O eixo é apoiado em uma estrutura metálica que dá estabilidade ao conjunto. Todo o núcleo da bobina, tem uma área transversal de 90 cm<sup>2</sup>. As duas bobinas foram enroladas em série nos braços paralelos, construídas com fio 17 AWG. Quando estas bobinas são alimentadas por uma tensão de 62 VDC, exigem uma corrente de 2A e produzem um campo estático de 117 mT no interior do gap.

A aferição do campo foi feita através de um Phywe Teslameter 13910.83, cuja ponta de prova foi usada de forma a varrer toda a área transversal do “gap” e depois foi montada uma tabela que nos mostra a relação entre a tensão aplicada, a corrente exigida e o campo gerado pelo equipamento. Usando 62 Volts a 2 Ampères, conseguimos 117mT (intensidade de fluxo usada no experimento) no centro da área transversal, e próximo às suas bordas houve uma queda de apenas 3mT devido ao pequeno espaço do “gap”. O eletroímã é refrigerado à ar e não se observa aumento de temperatura com a tensão elétrica usada, em vista de estar em ambiente com

---

<sup>1</sup> Rua Mascarenhas de Moraes, s/n - Recife - PE.

ar condicionado a 25°C. Uma imagem mais aproximada do “gap” pode ser vista na figura 3.

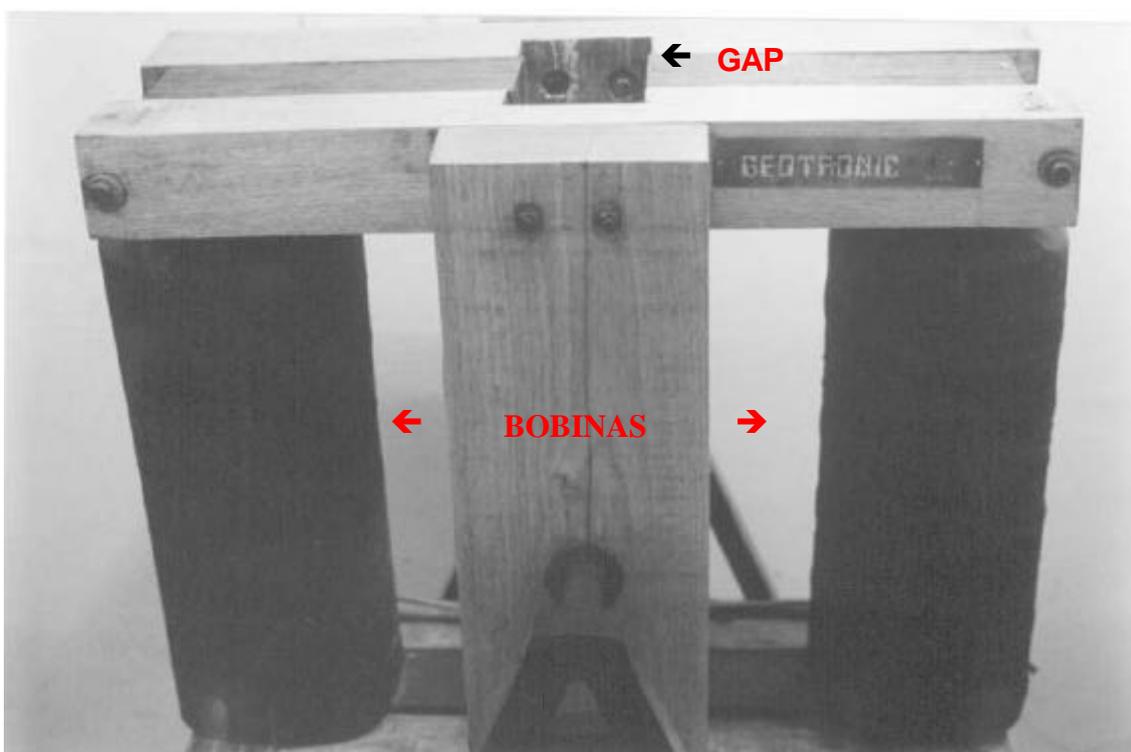


Figura 2. Gerador de campo magnético GEOTRONIC (117mT) utilizado para criar o campo para exposição dos animais deste experimento.

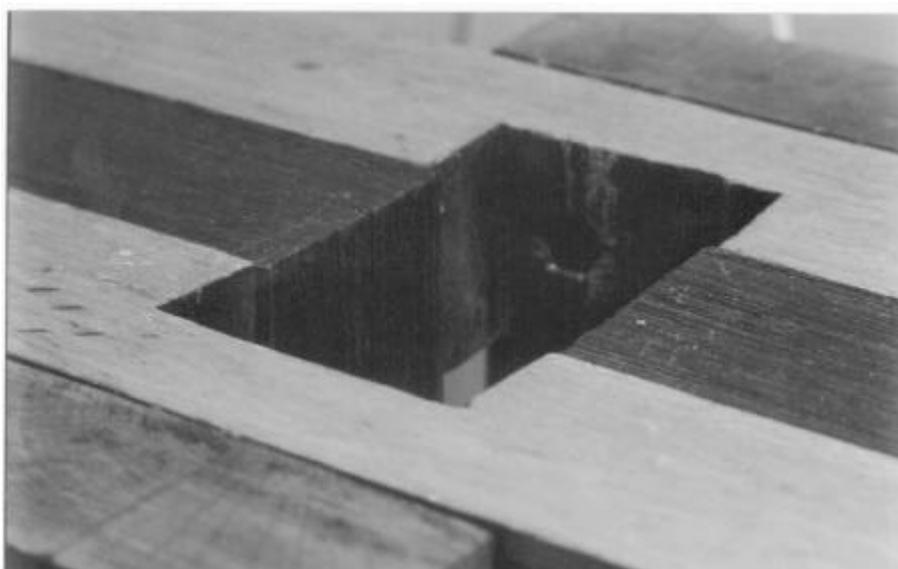


Figura 3. Fotografia aproximada do “gap”, utilizado para exposição dos animais ao campo magnético neste experimento.

A fonte de energia elétrica que alimenta o gerador de campo magnético é apresentada na Figura 4.

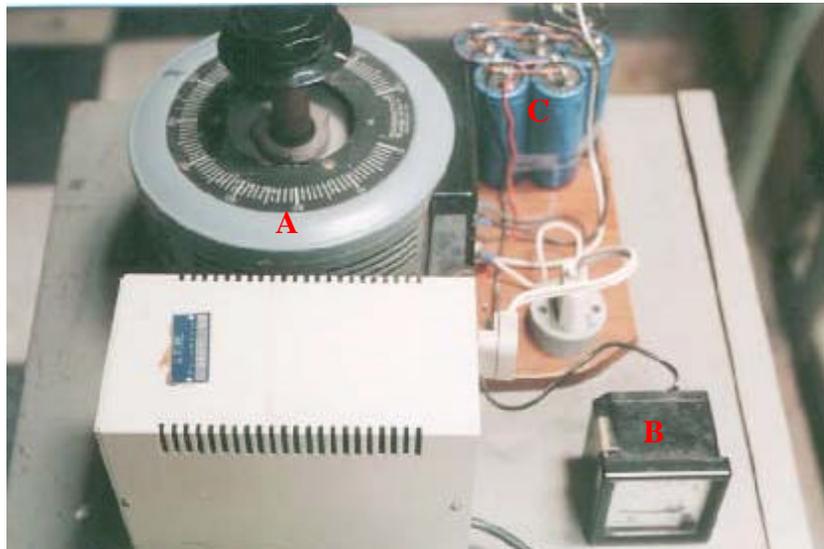


Figura 4. Regulador de tensão do gerador de campo magnético, onde podemos ver: **A** o transformador regulável; **B** um amperímetro e **C**, o circuito retificador.

Esta fonte de energia elétrica é composta basicamente de um transformador com saída variável (variac), que é alimentado com uma tensão elétrica de 220 Volts e fornece uma corrente elétrica com tensão variando de 0 a 220 Volts. Além disto, existe um circuito retificador com a finalidade de transformar a corrente alternada (AC) em contínua ou direta (DC). Foram usados também um banco de cinco capacitores elétricos, para estabilizar a tensão elétrica, o qual diminuiu a flutuação (ripple) a 1%, resultando em uma corrente contínua de boa qualidade. O controle de potência da fonte conta ainda com uma resistência de descarga para o desligamento do eletroímã, consumindo a o pulso de energia que retorna à bobina, do campo induzido, após o desligamento da corrente elétrica.

### 3.4 - Caixa de exposição dos animais

A caixa de exposição foi confeccionada em acrílico, com dimensões de 12 x 10 cm com profundidade de 15 cm. A tampa transparente permite observar os animais durante a exposição. Janelas horizontais laterais (1,5 x 4 cm), abertas a 3 cm abaixo da borda, permitem o travamento da tampa e o suporte de sustentação da caixa dentro do “gap” do eletroimã, através de uma peça de madeira, de 1 x 3,5 cm com 14 cm de comprimento, que é colocada através das janelas laterais (ver Figura 5). Deste modo ao animais contidos na caixa ficam totalmente cobertos pelas linhas de força que atravessam o “gap”.

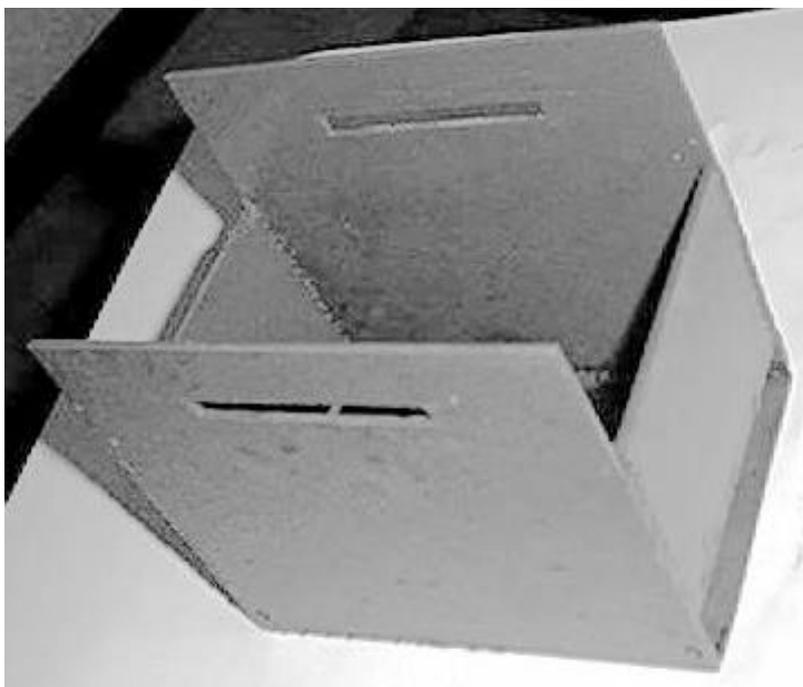


Figura 5. Compartimento utilizado para expor os animais ao campo magnético. Este compartimento é de acrílico para evitar alterações no fluxo do campo.

### **3.5 - Procedimento para pesagem dos animais**

Durante o experimento os camundongos foram avaliados quanto ao peso a cada 7 dias.

A medida do peso foi realizada no mesmo horário para todos os grupos, sendo que todos os animais de cada grupo foram pesados em conjunto, obtendo-se um valor médio para cada animal. A média do peso dos camundongos de cada grupo foi obtida dividindo-se o peso total do grupo pelo número de animais daquele grupo.

Essa forma de avaliação foi escolhida porque o tempo de exposição magnética foi diferenciado de grupo para grupo e não de animal para animal, além do que, as variações individuais foram assim evitadas, quando os resultados foram tomados pela média de cada grupo.

### **3.6 - Procedimentos para coleta de sangue**

A coleta de sangue foi realizada em três etapas para cada experimento, tendo cada etapa ocorrido num dia, e tendo cada etapa 1/3 dos animais de cada grupo.

Inicialmente, os animais foram anestesiados individualmente por via respiratória com uma solução de éter sulfúrico, sendo colocados em um becker de 200ml, que continha um “swab” de algodão umedecido com 5 ml de eter. O recipiente era tampado com uma placa de Petri, e o animal era observado até perder a consciência e cessarem movimentos musculares. Esta anestesia era suficiente para manter o animal vivo, mas de forma que qualquer ação sobre o mesmo fosse indolor. A partir daí, foi feita uma punção cardíaca em cada animal e retirado um volume de 0,5 ml de sangue. Para cada animal, foi utilizada uma seringa descartável de 3ml com agulha número 8, e após retirado o sangue, 400µl do mesmo foi transferido para o tubo microtainer que já contem o anticoagulante EDTA. Após transferido, o sangue foi agitado (suavemente) no tubo para mistura-se ao EDTA e evitar a hemocoagulação, assim como para evitar a quebra de hemácias (hemólise).

Após os procedimentos de coleta de sangue, que durou em média 20 minutos para cada etapa, o material foi levado para ser lido pelo contador de células *Coulter* e depois foram feitos esfregaços de lâminas para a avaliação microscópica. Este material tem um tempo máximo de 2 horas entre sua coleta e leitura no analisador hematológico *Coulter*, para ter-se um resultado confiável.

Devido à forma de coleta de sangue ser a punção cardíaca e a quantidade de sangue coletada ser de 0.5 ml, os camundongos não sobreviveram.

### 3.7 - Hemograma e Eletroforese

#### 3.7.1 Hemograma.

A análise dos elementos figurados do sangue foi feita de modo automático, pelo analisador hematológico *Coulter* Modelo T-890 que pode ser visto na Figura 6. Ele foi utilizado para fazer a determinação quantitativa e simultânea de hemácias, hemoglobina, contagem e distribuição de leucócitos. Este equipamento mede o número de células por volume unitário e identifica a sua forma, classificando o tipo de célula diferenciando as séries branca e vermelha do sangue; Afere o hematócrito, calculando volume unitário, volume corpuscular médio, hemoglobina média; Conta os componentes da série branca, distribuindo os valores de acordo com os elementos identificados por algoritmos de reconhecimento de formas.

Para a leitura das amostras de sangue retirada dos animais dos grupos controle e dos grupos testes, foram utilizados tubos específicos: "*Tubos Microtainer com EDTA K3*". Estes são apropriados para uso pelo *Coulter*, para a leitura das amostras, contendo apenas 400µl de sangue, o que é ideal para o estudo com camundongos, onde o volume sangüíneo que pode ser retirado, sem danos para o animal, é muito pequeno. Cada tubo contendo sangue de apenas um camundongo, perfaz um total de 45 tubos por experimento.

#### 3.7.2 Eletroforese .

Para analisar alterações macromoleculares no sangue, foi feita a eletroforese do plasma sangüíneo dos camundongos sendo para isto utilizada a técnica SDS-PAGE. A **dosagem das proteínas** teve sua concentração protéica estimada pelo método de Bradford, utilizando soro albumina bovina como padrão (BRADFORD, 1976). As determinações foram realizadas em espectrofotômetro Beckman (DU-640). Na **preparação dos géis de poliacrilamida**, os géis de resolução foram preparados em sistema *HOEFER® MIGHTY SMALL II - PHARMACIA BIOTECH*, utilizando espaçadores de

0.75mm. A concentração da acrilamida utilizada no gel foi de 12.5%. O gel de empacotamento foi preparado com 4,5% de acrilamida. **A preparação das amostras** ocorreu a partir das amostras irradiadas e não irradiadas de plasma sanguíneo de camundongos, estas foram diluídas 1:1 em solução tampão segundo LAEMMLI(1970) (60mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 25% glicerol; 0,1% azul de bromofenol; 14,4 mM de 2-mercaptoetanol). Para a eletroforese em presença de SDS, as proteínas misturadas com tampão de amostra, e em seguida foi feita a corrida. **Para realizar a corrida** foi utilizado o sistema vertical de eletroforese *HOEFER® MIGHTY SMALL II - PHARMACIA BIOTEC* acoplado a uma fonte *VOKAM-SAE 2761*, com voltagem constante de 150V, contendo 25 mM Tris, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS como tampão de corrida. Após a corrida, as proteínas foram fixadas e coradas com azul de coomassie (BOLLAG, 1991).



Figura 6. Vista frontal do equipamento *Coulter T-890* utilizado na análise do sangue dos animais. Encontra-se no setor de hematologia do Hospital das Clínicas - UFPE.

O procedimento utilizado neste protocolo foi o descrito por BOLLAG (1991), sendo as amostras de plasma aplicadas da seguinte forma: padrão, controle, exp 1h, exp 2h, exp 1h, exp 2h , segundo o esquema abaixo apresentado na figura 7. Ou seja, em cada eletroforese foram usados amostras de 5 camundongos: um controle, dois expostos durante 1 hora (exp1) e dois expostos por 2 horas (exp2). O uso das amostras exp1 e exp2 repetida, teve como objetivo comparar e confirmar os resultados, sendo, portanto, cada amostra (exp1 = E1h) e (exp2 = E2h) provenientes de animais distintos.

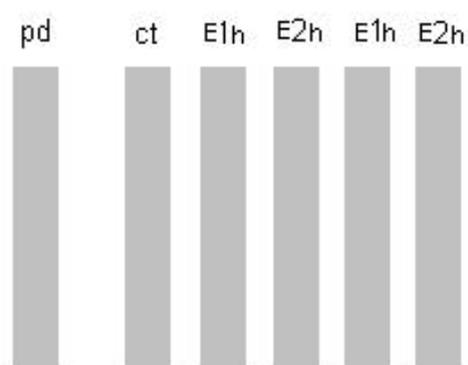


Figura 7. Representação esquemática do sistema sequencial das corridas das amostras no gel de poliacrilamida. *Pd* = padrão, *ct* = controle, *E1h* = exposto 1h, *E2h* = exposto 2h

### 3.8 - Exposição ao Campo Magnético Estático (CME)

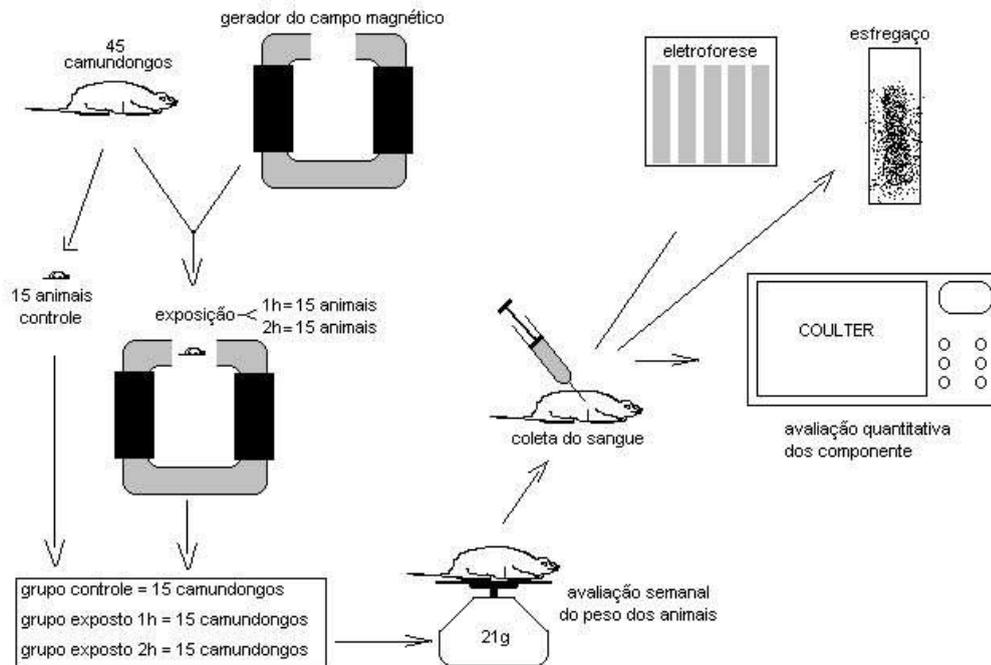


Figura 8. Esquema geral de exposição dos camundongos ao campo magnético e as etapas de coleta de dados

Foram separados 3 grupos de 15 camundongos e cada grupo colocado em uma gaiola de arame, com capacidade máxima de 20 camundongos, cuja medida é de 17x37x30 cm.

O experimento com estes primeiros três grupos (experimento 1) teve a duração de trinta dias, sendo um grupo controle, e dois grupos expostos ao campo magnético estático com 117 mT de intensidade, durante uma e duas horas respectivamente, como mostra o esquema de exposição ao CME. Ao final do experimento 1, iniciamos o experimento 2 com uma segunda população de camundongos, idêntica à primeira, também composto por 45 camundongos e divididos em três grupos como no experimento 1 com o objetivo de confirmar

os dados obtidos e de aumentar a população analisada, para maior confiabilidade estatística.

O grupo controle refere-se ao grupo de camundongos que não foi exposto ao campo CME.

Os grupos experimentais foram expostos ao campo magnético de 117mT durante uma hora por dia, no grupo exp1, e duas horas no grupo exp2. O período total de exposição para cada grupo foi de 30 horas para o grupo exp1 e 60 horas para o grupo exp2.

Na Figura 8, podemos ver esquematicamente os procedimentos de exposição e avaliação dos animais e na Tabela 1, está esquematizado o procedimento adotado para a exposição dos camundongos aos campos magnéticos estáticos.

**Tabela 1.** Período de duração da exposição dos camundongos ao CME, apresentando a quantidade de horas diária de exposição para cada grupo e a quantidade de dias total do experimento.

Experimento 1	Exposição ao CME	Duração
Grupo controle	Não exposto	30 dias
Grupo exp1	1 hora/dia	30 dias
Grupo exp2	2 hora/dia	30 dias
Experimento 2		
Grupo controle	Não exposto	30 dias
Grupo exp1	1 hora/dia	30 dias
Grupo exp2	2 hora/dia	30 dias

Devido ao tamanho reduzido do “gap” do gerador de CME, a exposição do grupo exposto foi realizada em três vezes para cada grupo, ou seja, foram expostos 5 camundongos por vez, o que exigiu também um cronograma para as exposições, o que está mostrado na tabela 2 abaixo. O compartimento (caixa) utilizado para expor o animal é o apresentado na foto 5, compartimento este que adaptava-se às medidas do “gap”. O grupo controle também foi colocado em um compartimento de mesmas características, porém com o eletroímã desligado, durante o período de uma hora.

**Tabela 2.** Período de exposição diária dos camundongos ao CME. Apresenta a subdivisão de cada grupo e os horários em que foram expostos, e a quantidade de horas de exposição

	Grupos	Período	Total (horas)
Exp1	5 animais	08:00 - 09:00	1
	5 animais	09:00 - 10:00	1
	5 animais	10:00 - 11:00	1
Exp2	5 animais	11:00 - 13:00	2
	5 animais	13:00 - 15:00	2
	5 animais	15:00 - 17:00	2

Deste modo, um total de 30 animais por experimento, totalizando uma população de 60 animais, foram expostos ao CME. Isto implicou em um período de funcionamento do eletroímã de 270 horas, porém em vista da climatização da sala onde ele se encontra, não foi notado sobre-aquecimento.

### 3.9 - Processamento dos dados eletroforéticos

Este sistema computadorizado propõe-se à aquisição e análise de imagens principalmente no que tange aos exames de materiais genéticos realizados em SDS-PAGE, assim como de proteínas em geral.

Este trabalho se beneficiou deste software porque procurou identificar proteínas do plasma sanguíneo pelo SDS-PAGE, a quantificação das proteínas e frações não puderam ser realizadas, em vista de não haver microdensitômetros disponíveis. Deste modo, como se tratou de uma separação de proteínas em SDS-PAGE, que resulta em imagens das frações coradas de acordo com seu peso molecular e do seu teor no plasma, o método prestou-se perfeitamente.

Inicialmente é feita a eletroforese em gel de poliacrilamida, com tampão SDS, do plasma do sangue dos animais estudados.

Após a aquisição da imagem (em formato .bmp), o software nos dá uma imagem da separação das proteínas e ainda os valores em forma de gráfico. O valor da saturação de cor na imagem obtida, por fotografia do gel, é transformado por coordenadas ortogonais, em valores do eixo das abcissas, fazendo deste modo a quantificação do volume de proteína deslocado até à sua faixa de peso molecular. Os valores do eixo das ordenadas têm origem nos picos de saturação de cor ao longo do gel, a partir do ponto onde foi depositado o plasma a ser analisado. Ele traduz o peso molecular, por comparação com padrões, que são fornecidos pelos fabricantes do kit de análise SDS-PAGE, que têm os seus pesos moleculares conhecidos, e que estão apresentados abaixo.

1. <i>Myosin</i>	200.000
2. <i>b-galactosidade</i>	116.250
3. <i>Phosphorylase b</i>	97.400
4. <i>Serum albumin</i>	66.200
5. <i>Ovalbumin</i>	45.000
6. <i>Carbonic anhydrase</i>	31.000
7. <i>Trypsin inhibitor</i>	21.500
8. <i>Lysozyme</i>	14.400
9. <i>Aprotinin</i>	6.500

Este software foi criado pelo (DEES/UFPE) sob a supervisão do professor *Ascendino Silva*. Ainda não existe um distribuidor para este software que está em fase experimental. Por este motivo, colocamos em anexo um texto explicativo do funcionamento do mesmo. Ver Anexo 2.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Peso médio dos animais

O resultado da coleta de dados de peso dos animais está apresentada na tabela 3 e representada graficamente na Figura 9 para os animais do experimento 1 e 2. Esta coleta ocorreu durante os 30 dias para ambos experimentos

**Tabela 3.** Variação semanal do peso dos animais, a quantidade de animais por grupo e o peso médio dos animais em cada grupo.

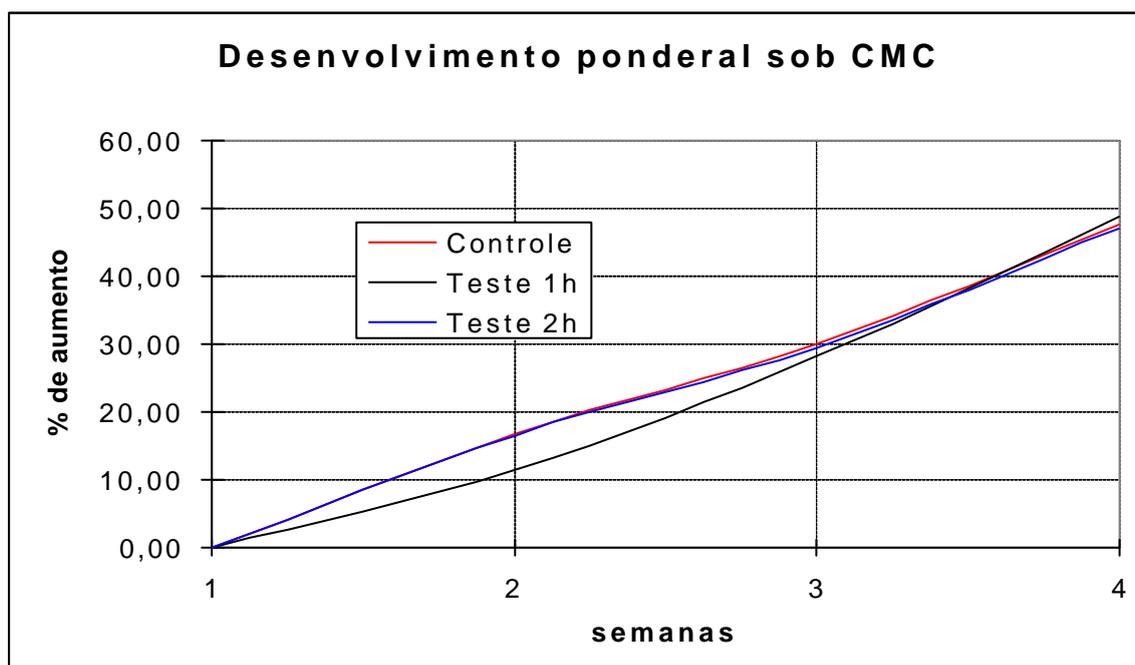
Semana	Grupo	Peso do Grupo	Peso Médio do Animal	Número de animais
1	Controle	326.40	21.76	15
	Teste 1h	328.65	20.63	15
	Teste 2h	309.45	21.91	15
2	Controle	381.15	25.41	15
	Teste 1h	345.00	23.00	15
	Teste 2h	384.00	25.56	15
3	Controle	424.65	28.31	15
	Teste 1h	396.60	26.44	15
	Teste 2h	425.70	28.38	15
4	Controle	482.40	32.16	15
	Teste 1h	460.80	30.72	15
	Teste 2h	483.45	32.23	15

Para a análise gráfica dos dados da tabela 3, foi utilizado o crescimento percentual dos animais, visto na tabela 4 que foi construída considerando a primeira leitura dos grupos, obviamente como sendo 0% (zero por cento) de crescimento. As semanas seguintes mostram portanto, um percentual do crescimento ponderal do grupo em relação ao peso inicial de cada grupo.

**Tabela 4.** Variação percentual do peso dos grupos de animais, tomando como ponto de partida o peso médio inicial de cada grupo, que foi considerando nulo.

Grupo	Semana I	Semana II	Semana III	Semana IV
Controle	0,00	16,77%	30,10%	47,79%
Teste 1h	0,00	11,49%	28,16%	48,91%
Teste 2h	0,00	16,66%	29,53%	47,10%

Os dados da tabela 4, resultaram no Gráfico da figura 9, que oferece uma melhor visualização da comparação dos dados dos grupos observados.



**Figura 9.** Crescimento percentual semanal dos camundongos separados em 3 grupos cujos pesos estão sendo avaliados. Gráfico montado a partir da tabela 4

WAGIH (1981), utilizando campo magnético de 60 Hz realizou um protocolo de acompanhamento de peso dos (camundongos) expostos ao

campo magnético durante uma semana. Os seus resultados indicaram que os seus animais expostos apresentaram uma tendência de perda de peso em relação ao controle. Segundo o autor, esta perda de peso de 3.77 % do grupo exposto e o ganho de 4.76 % do grupo controle não apresentam valores significativos, por isto são considerados como uma tendência. É importante observar que o campo usado por WAGIH (1981) foi um campo magnético alternado com frequência de 60Hz.

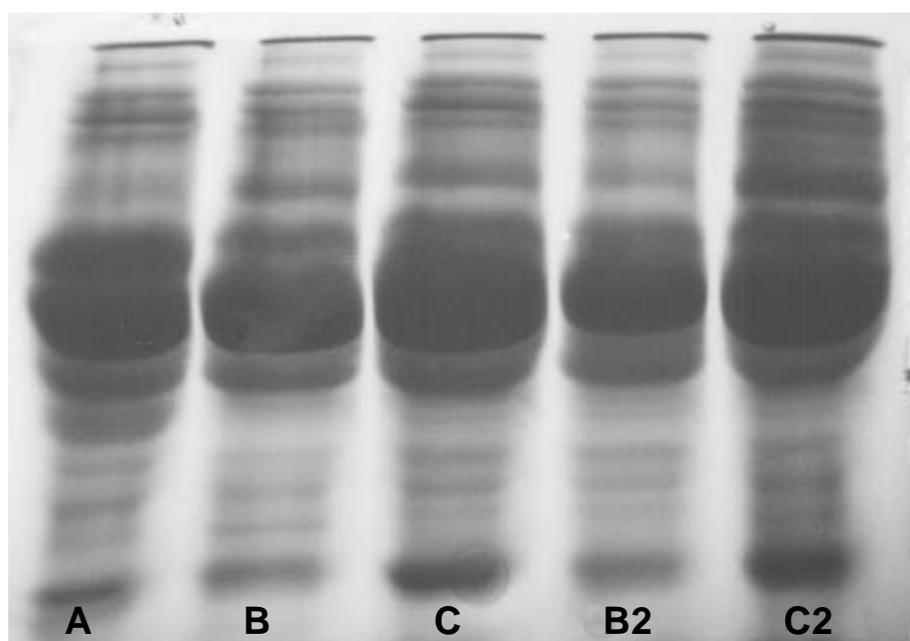
RUSSEL e HEDRICK apud BARNOTHY (1969), realizaram experimentos com ratos sob um campo magnético estático de 4200 Oe (0,42 mT) por 4 semanas e observaram que os níveis de atividade física dos animais juntamente com os níveis de ingestão de água e alimento aumentaram. Os autores concluíram que mesmo de forma não significativa, quando os animais foram expostos ao campo magnético alternado, estes tenderam a apresentar uma queda da massa corpórea, porém, quando estes foram expostos ao campo magnético estático, tenderam a apresentar um leve aumento dos fatores (maior consumo de alimento e água) que contribuem com o aumento de sua massa corpórea.

Observamos que onde foi usada uma fonte de campo magnético estático com 117 mT, o ganho de peso dos animais não apresentou diferença em relação aos grupos experimentais e controle. No entanto, o grupo experimental 2h apresentou um leve retardo no ganho de peso nas duas primeiras semanas. Este comportamento, já foi analisado e visto que estatisticamente não é significativo, no entanto, a curva traçada para representar o ganho de peso dos animais mostra que existe uma tendência de um desenvolvimento do peso mais retardado nos animais do grupo experimental com exposição por 1h.a 117 mT

## 4.2 - Eletroforese do plasma

As alterações induzidas na albumina em suas frações alfa, beta e gama por campos magnéticos alternantes (CMA) com frequência 60 Hz já foram estudadas (WAGIH, 1981), não tendo revelado alterações estatisticamente significativas e usando a metodologia de rotina em sangue de ratos, para obter o plasma sangüíneo. Não foi encontrado, na literatura consultada, trabalho usando CME em plasma sangüíneo de ratos, estudando as proteínas séricas.

O resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, pode ser vista na Figura 10.

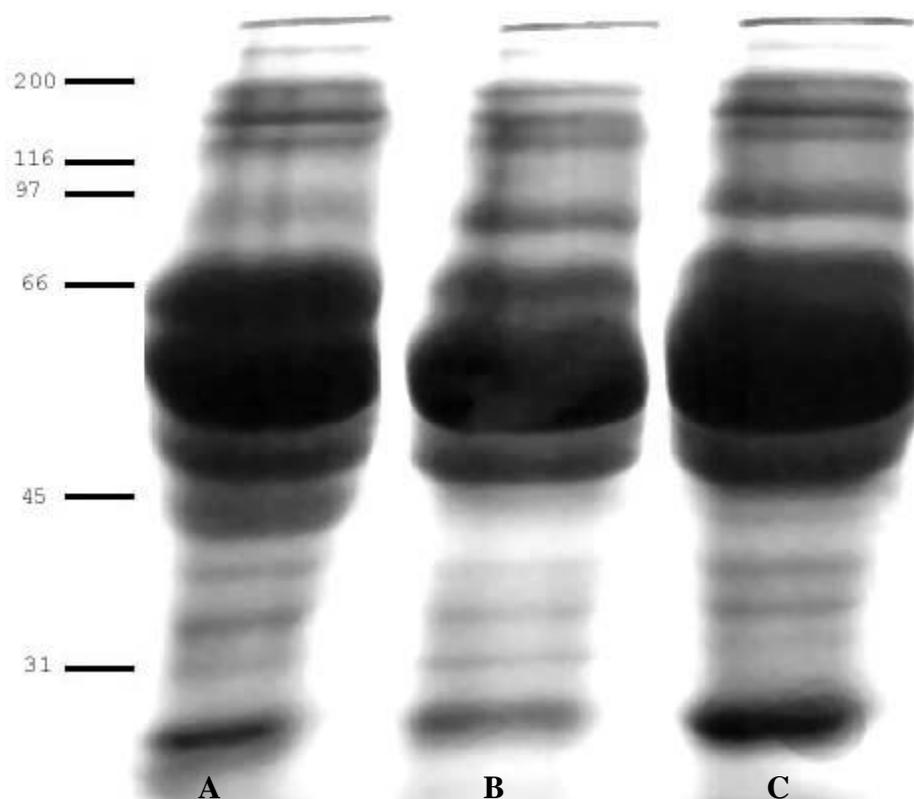


**Figura 10.** Eletroforese do plasma dos animais do grupo controle e experimentais 1h e 2h, realizada em gel de poliacrilamida. **A**= grupo controle; **B**= grupo exposto 1h; **C**= grupo exposto 2h. **B2** e **C2** diferem de **B** e **C** por serem de animais distintos.

Foi realizada uma avaliação semi-quantitativa em relação ao peso específico das principais proteínas do plasma, através da Figura 11 utilizando-se um programa experimental específico, elaborado pelo Laboratório de

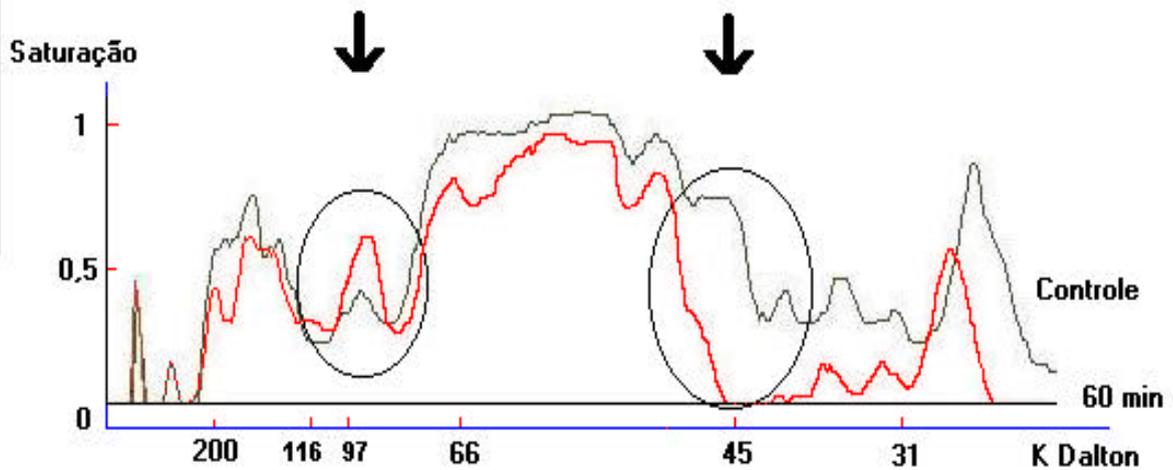
Reconhecimento de Padrões do Departamento de Engenharia Eletrônica e Sistemas, da UFPE.

Este software experimental, denominado DATA-GEL - Sistema de Reconhecimento de Padrões, foi desenvolvido pela equipe do professor Prof. Dr. Ascendino Silva , realizou uma estimativa de variação da intensidade e localização de cada banda, utilizando a imagem mostrada na Figura 11.

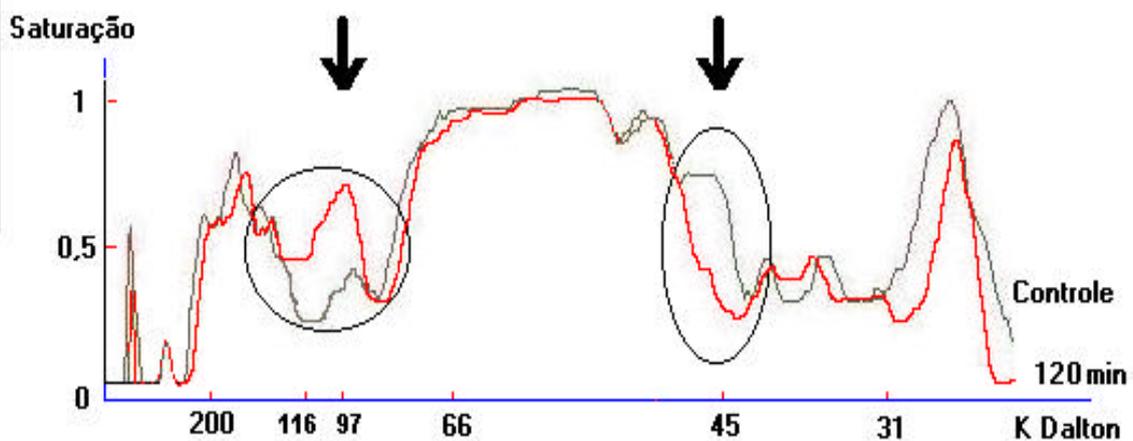


**Figura 11.** Eletroforese com representação dos três grupos do experimento, mais a representação do padrão. **A**= controle; **B**= exposto 1h; **C**= exposto 2h

A partir da análise da Figura 11 pelo DATA-GEL, foi obtido o gráfico da Figura 12, representando a comparação dos valores obtidos no grupo controle com o grupo exp1 e também o gráfico da Figura 13, mostrando a comparação do grupo controle com os valores resultantes do grupo exp2.



**Figura 12.** Representação gráfica da eletroforese para o grupo exposto 1h, utilizando-se o DATA-GEL.; No eixo das ordenadas encontramos um valor de saturação que foi dado, considerando 1 a maior leitura; No eixo das abscissas, os valores dos pesos moleculares em KDa Neste gráfico estão representados os grupos controle e exp1 (60min).



**Figura 13.** . Representação gráfica da eletroforese para o grupo exposto 2h, utilizando-se o DATA-GEL.; No eixo das ordenadas encontramos um valor de saturação que foi dado considerando 1 a maior leitura ; No eixo das abscissas os valores dos pesos moleculares em KDa Neste gráfico estão representados os grupos controle e exp2 (120 min).

Os gráficos mostram claramente a diferença de amplitude dos picos de saturação de cada proteína, tornando maior o contraste entre as amostras não expostas e as expostas ao CME.

O comportamento da eletroforese foi estudado utilizando-se os gráficos originados pelo sistema DATA-GEL.

Através da análise visual das imagens do SDS-PAGE vista na Figura 11, pode-se observar algumas alterações, confirmadas na análise com o DATA-GEL (Figuras 12 e 13), indicando variação do teor de proteínas, no plasma de animais expostos ao CME. As duas alterações mais importantes consistem em uma banda em torno dos 97 KDa que se apresenta com maior densidade nos grupos experimentais 1h e 2h do que no grupo controle; uma outra banda (45 KDa) que praticamente desaparece nos grupos experimentais 1h e 2h e que encontra-se bem marcada no grupo controle

Analisando o gráfico da Figura 12, referente aos animais que foram expostos durante 60 min comparados com o grupo controle. Observamos que existe um desalinhamento entre alguns picos apresentados pelas duas linhas do gráfico, referentes às bandas, o que também pode ser visto nas figuras 10 e 11, onde existe um leve desalinhamento entre os picos obtidos. Este artefato se deve à flexibilidade do gel onde foram feitas. No entanto, estas alterações não trazem problemas, pois a análise dos gráficos foram apoiados nas fotografias das imagens cujas bandas estão bem definidas.

Foram estudadas apenas as bandas que estão com pesos na faixa de 97.4 KDa e 45 KDa, que tanto em uma análise visual da fotografia quanto na observada pelos gráficos, não deixam dúvidas quanto as suas variações após o tratamento com o CME.

No gráfico da Figura 12, a alteração na faixa de 97.4 KDa é bem evidente não só pelo fato do pico estar mais alto do que o controle, mas também pela forma da curva referente aos dois grupos. O mesmo ocorre com a banda referente a 45 KDa, sendo que neste caso há uma inversão, ou seja, o grupo experimental 1h não forma um pico, evidenciando quase uma ausência da banda naquele local. Isto evidencia um ação estimulante do CME sobre a proteína que tenha o peso de 97,4 KDa e também uma inibição sobre a proteína sérica, cujo peso é 45 KDa

No gráfico da Figura 13, que se refere à comparação entre os grupos controle e o experimental 2h, observamos um comportamento semelhante ao do gráfico da Figura 12, entretanto com alterações na quantidade de frações que deslocaram-se para as faixas de peso estudadas. Assim, na faixa de 97 KDa observa-se uma diferença maior entre as amplitudes do picos, revelando que o volume deslocado após duas horas de exposição ao campo foi maior que o observado com uma hora de tratamento, caracterizando um fenômeno tempo-dependente. Na faixa de 45 KDa, a diferença foi menor após duas horas ao CME, com a formação de um pico de absorção, sugerindo uma redução da inibição observada com uma hora de tratamento, no volume circulante da proteína com 47 KDa

A proteína com peso molecular de 45 KDa usada pela amostra do padrão refere-se (segundo a tabela que acompanha o Kit SDS-PAGE da BIO-RAD) à proteína ovoalbumina.

WHITE (1976) apresentou um quadro com os principais componentes protéicos do plasma humano e suas propriedades (entre elas o peso molecular), onde entre outras, encontramos a proteína Inter-alfa-globulina cujo peso molecular é igual a 45 KDa No entanto, GROOT (2001) refere-se à inter-alfa-globulina (TBG) como uma cadeia de 415 aminoácidos, com peso molecular de 54 KDa Caso esta proteína seja tratada sem seu ligante, que pesa 10 KDa - ficando a proteína então com 395 aminoácidos - seu peso molecular fica em 44 KDa

Outras proteínas foram identificadas por HIMENO et al (1996), utilizando plasma de rato como selenoproteína P, duas das quais têm peso molecular de 45 KDa . Esta é uma proteína extra-celular que contém mais de 60% do selênio do plasma do rato. A forma do selênio contido na proteína é a selenocisteína, assim como na “selenoprotein glutathione peroxidase”. Também tem este peso a “iodothyronine-5'-deiodinase tipo 1” HIMENO (1996).

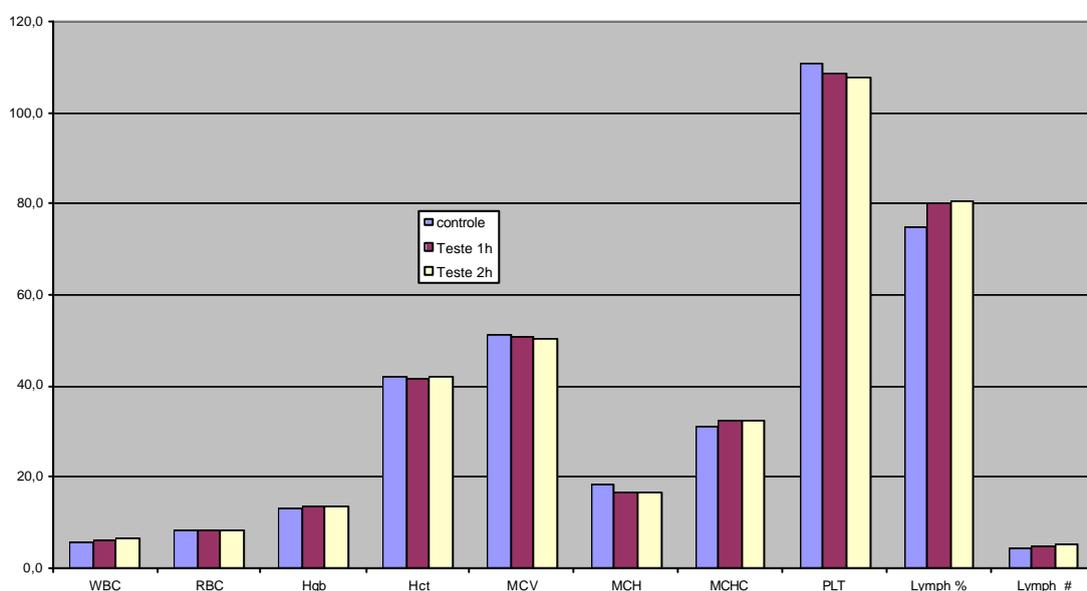
No caso da banda cujo peso molecular equivale ao da proteína usada pelo Kit da BIO-RAD, a proteína que refere-se à faixa de 97.4 KDa é a fosforilase b. Não encontramos citações na literatura consultada de outras moléculas com pesos moleculares semelhantes a este.

Finalmente, podemos concluir que existe pelo menos duas frações no plasma sanguíneo que encontram-se na faixa dos 45 KDa e 97 KDa e que têm suas concentrações no plasma, sensíveis ao campo magnético. Para a banda encontrada na faixa dos 97.4 KDa, não conseguimos encontrar referência de proteínas com este peso, a não ser, a usada no padrão: fosforilase b. Mas ao que se refere à banda de 45 KDa, existe uma forte possibilidade de se tratar de uma selenoproteína. Faz-se necessária, no entanto, a continuação deste estudo, desta vez direcionando-se à marcação das frações encontradas nestas faixas de peso molecular e conseqüente identificação das mesmas e estudos de suas funções.

### 4.3 - Resultados obtidos pelo analisador hematológico Coulter

A esta altura, alguém pode perguntar: mas será que não existe nenhum trabalho que tenha se dedicado a estas informações? Como foi dito na introdução deste trabalho, as pesquisas com campo magnético têm se intensificado bastante. *WAGIH (1981)*, estudou o efeito do campo magnético **alternado** em ratos, enfocando alguns parâmetros tais como peso, volume de água consumido, proteínas do sangue e outros. Vale lembrar que os bioefeitos do campo magnético, variam bastante com a intensidade; tempo de exposição e frequência.

No anexo 1, podemos encontrar os dados obtidos pelo equipamento *Coulter*, e abaixo, temos um gráfico (Figura 14) montado a partir da média dos valores obtidos, sendo que a informação referente às plaquetas está com seu valor dividido por 10, ou seja, o valor 100 refere-se ao valor 1000. O objetivo desta divisão foi a não deformação do gráfico representado na Figura 14.



**Figura 14.** Representação gráfica dos valores dos elementos figurados do sangue dos camundongos avaliados no equipamento *COUTER*.

\* Os valores correspondentes às plaquetas (PLT) foram divididos por 10 para uma representação no mesmo gráfico. Assim, o valor correspondente a 100 é 1000.

Foi aplicado o teste *t* nestas amostras e encontramos que, com exceção dos linfócitos (Lymph %) que teve um aumento de 6,8%, para o exp1 enquanto para o exp2, aumentou 7,74%, nenhuma das diferenças observadas foi significativa ao nível de  $r = 0,05$ . As plaquetas (PLT) apresentaram uma discreta redução na contagem, proporcional ao tempo de exposição ao CME, que apesar de não significativa, representa um forte tendência.

Alterações no número de linfócitos não são difíceis de ocorrerem. Existem na literatura, relatos de variação de vários fatores como temperatura, nível de estresse, ansiedade, sexo, raça, produtos químicos e alguns fenômenos físicos, que podem alterar o número de linfócitos sem que isto seja considerado patológico. O aumento de linfócitos observado neste trabalho se incluiria nesta categoria, visto que os animais estavam estressados durante o tratamento ao campo magnético, se os controles também apresentassem linfocitose. Porém de acordo com o trabalho de A. Likhachev, houve um aumento de linfócitos apenas nos grupos expostos e que foi proporcional ao tempo de exposição.

#### **4.4 - Resultados obtidos pelo exame histológico dos esfregaços.**

Os resultados da análise dos esfregaços, não revelaram quaisquer anomalias na série branca e vermelha, sendo portanto perfeitamente compatíveis com os dados fornecidos pelo analisador hematológico. Deste modo, a morfologia e as características histológicas das hemácias não sofreram mudanças com a aplicação do CME, com a intensidade utilizada neste trabalho. Do mesmo modo, os leucócitos apresentaram-se com padrões histológicos homogêneos para os grupos controle e expostos ao CME.

Este resultado já era esperado, visto que não existe menção na literatura a alterações deste tipo, na faixa de intensidade que foi usada, em ratos. Além disso, a intensidade do CME à qual foram expostos os animais, é pequena para desencadear alterações deste tipo em animais adultos, quando aplicada em exposição de corpo inteiro. Certamente, os CME mais intensos poderiam causar um efeito mais.

## 5 - CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos podemos inferir as seguintes conclusões:

1. Houve alterações no número de linfócitos, com aumento proporcional ao tempo de exposição ao CME de 117 mT, estatisticamente significativa.
2. O plasma dos camundongos expostos ao CME apresentou alteração na intensidade das bandas de duas proteínas cujos pesos moleculares estão na faixa de 97.4 KDa e 45 KDa.
3. Não foram observadas modificações histológicas nas séries branca e vermelha do sangue, causadas pela aplicação do CME.
4. As influências do CME no ganho ou perda de peso dos animais, não mostraram qualquer efeito significativo.

As perspectivas futuras apontam para o estudo específico do comportamento dos linfócitos e para a purificação e identificação das proteínas influenciadas pelo campo magnético no objetivo de identifica-las de fato e de comprovar os efeitos verificados "in vivo".

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, B. D. Biomagnetismo - nova interface entre a física e a biologia, **Ciência Hoje**, São Paulo, SP, vol. 26, n. 153, p. 25-33, set. 1999

ATEF, M. M.; ABDEL-BASET, M. S.; EL-KAREEM, A. et al, Effects of a static magnetic field on hemoglobin structure and function. **J. Biol Macromol** (2):105-111, 1995

BARNES, S F. The Effects of Time Varying Magnetic Fields on Biological Materials, **IEEE Transactions on Magnetics**, Vol. 26, N 5, september 1990.

BARNOTHY, M. F. **Biological Effects of Magnetic Fields**, Plenum Press, NY-London, vol 2, 1969

BLANK, M. and SOO, L., The Na,K-ATPase as a model for electromagnetic-field effects on cells, **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, 30 (1-3):85-92. (1993)

BOLLAG, M. DANIEL. **Protein Methods**, Wiley-liss, New York, 1991 ISBN 0-471-56871-6

BRONZINO, JOSEPH. D. **The Biomedical Engineering Handbook** Ed IEEE PRESS, USA, 1995. ISBN 0-8493-8346-3

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72: 248-254, 1976

DUGGAR, B. M. **Biological Effects of Radiation** Ed. McGraw-Hill Book Company, NY-London, vol 1, 1936

FEYCHTING, M and AHLBOM, A. Magnetic Fields and Cancer in Children Residing Near Swedish, **American Journal of Epidemiology**, v.138, N.7, 1993

FIORINI, M; BIAGIARELLI, B. at al. In vitro Effects of 50Hz Magnetic Fields on Oxidatively Damaged Rabbit Red Blood Cells. **Bioelectromagnetics**, vol. 18, n 2, 1997. ISSN 0197-8462.

FRANK, P; MELVILLE, D; ROATH, S. Axial Particle Trajectory Measurements in High-Gradient Magnetic Separation, **IEEE Transactions on Magnetics**, Vol. Mag-15, N 2, march 1979.

GALVANOVSIS, JJURIS; SANDBLOM, JOHN at al. Cytoplasmic  $Ca^{2+}$  Oscillations in Human Leukemia T-Cells are Reduced by 50Hz Magnetic Fields. **Bioelectromagnetics**, vol 20, n 5, 1999. ISSN 0197-8462.

GROOT, L. J.; HENNEMANN, G; REFETTOFF S. **Thyroid and its Diseases**. Massachusetts, 2001. Disponível em: < <http://www.thyroidmanager.org/>>.

HIMENO, S; CHITTUM, H. S; BURK, R. F. Isoforms of Selenoprotein P in Rat Plasma. **The Journal of Biological Chemistry**, EUA, vol. 271, n. 28, pp. 15769-15775, Jun. 1996.

MALMIVUO, J; PLONSEY, R. **Bioelectromagnetism** Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields, Oxford University Press, NY, 1995. ISSN 0-19-505823-2

MARKOV, Marco S. Biological Mechanisms of the Magnetic Field Action, **IEEE Transactions on Magnetics**, Vol. Mag-17, N 5, 1981.

MASAAKI, LINO. Effects of a Homogeneous Magnetic Field on Erythrocyte Sedimentation and Aggregation **Bioelectromagnetics**, vol 18, n 3, 1997. ISSN 0197-8462.

MELVILLE, D; FRANK, P; ROATH S. Fractionation of Brood Components Using High Gradient Magnetic Separation, **IEEE Transactions on Magnetics**, Vol. Mag-18, N 6, 1982.

MOTTA, M.; HAIK, Y.; GANDHARI, A.; CHEN, C. J., High Magnetic Field Effect on Human Deoxygenated hemoglobin Light Absorption, **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, Vol. 47, p297-300, August,1998

PLANETCATFISH. Disponível em < <http://www.planetcatfish.com/> >. Acesso em: 05 abril 2001

POLK, C; POSTOW, ELLIOT. **Biological Effects of Electromagnetic Fields**, 2 ed, New York, N.Y., 1995, 618 p. ISBN 0-8493-0641-8.

SAVITZ, D. A; WACHTEL, H. et al. Case-Control Study of Childhood Cancer and Exposure to 60-Hz Magnetic Fields **American Journal of Epidemiology**, Vol. 128 n 1, 1988, EUA.

SEZE, R; TUFFET, S; MOREAU, J-M; VEYRET, B. Effects of 100 mT Time Varying Magnetic Fields on the Growth of Tumors in Mice. **Bioelectromagnetics**, vol. 21, n 2, feb. 2000

SHIGA, T.; OKAZAKI, M.; SEIYAMA, A.; MAEDA, N. Paramagnetic attraction of erythrocyte flow due to an inhomogeneous magnetic field, **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, vol. 30, p. 181-188, 1993

SUDA, TAKAO. Magnetic Orientation of Red Blood Cell Membranes, **IEEE Transactions on Magnetics**, Vol. 30, N , november 1994.

WAGIH, Z. Fam. Biological Effects of 60-Hz Magnetic Field on Mice, **IEEE Transactions on Magnetics**, Vol. Mag-17, n 4, july 1981.

WHITE, ABRAHAM. **Princípios de Bioquímica**, Guanabara Koogan, 5<sup>a</sup> ed., 1976, Rio de Janeiro, RJ

WILLIAMS J. W.; BEUTLER E.; ERSLEV A. J. et al. **Hematologia**. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 1976

WINTROBE, M. M. **Hematologia Clínica – Tomo I**, 4<sup>a</sup> ed. Buenos Aires, Argentina: INTER-MÉDICA. 1041 pág.,

## 7 - ANEXO

## 7.1 - ANEXO 1

Valores obtidos pelo contador *Coulter* pela análise do sangue dos animais.

### GRUPO CONTROLE

Núm. animais	WBC	RBC	Hgb	Hct	MCV	MCH	MCHC	Plaquetas	Lymph %	Lymph #
1	6,0	7,6	8,4	37,1	48,7	11,0	22,7	783,0	73,0	4,4
2	3,4	8,8	13,9	44,8	51,0	15,7	30,9	809,0	83,6	2,8
3	6,8	8,5	13,6	43,1	50,6	16,0	31,6	1424,0	77,2	5,2
4	10,4	8,6	13,9	43,1	50,0	16,1	32,3	870,0	74,1	7,7
5	3,4	8,1	13,3	41,8	51,8	16,4	31,8	1113,0	71,8	2,4
6	5,0	7,6	12,8	39,8	52,2	16,8	32,1	1238,0	79,1	4,0
7	4,5	7,4	13,5	41,5	55,9	18,2	32,5	1347,0	75,6	3,4
8	7,9	7,4	13,2	40,0	54,2	17,8	32,9	1325,0	82,9	6,6
9	3,8	8,3	13,4	43,2	52,2	46,2	31,0	1407,0	66,4	2,6
10	7,0	8,6	13,6	42,9	49,7	15,8	31,7	1029,0	77,5	5,4
11	1,1	8,3	13,0	41,1	49,5	15,6	31,6	1122,0	72,2	1,8
12	3,5	8,5	13,2	41,4	49,0	15,6	31,7	1050,0	80,8	2,8
13	9,6	8,9	14,4	45,4	51,2	16,2	31,7	879,0	60,1	5,8
Média 1	5,6	8,2	13,1	41,9	51,2	18,3	31,1	110,7	74,9	4,2

### GRUPO EXPOSTO – 1 HORA

Núm. animais	WBC	RBC	Hgb	Hct	MCV	MCH	MCHC	Plaquetas	Lymph %	Lymph #
1	4,7	7,95	13,5	42,5	43,4	17,0	31,8	1175,0	83,3	3,9
2	10,4	8,29	13,2	41,2	49,7	16,0	32,1	513,0	82,2	8,5
3	8,6	7,94	13,4	40,7	51,3	16,9	33,0	1455,0	79,1	6,8
4	6,0	7,84	13,5	42,4	54,1	17,2	31,8	1007,0	87,8	5,3
5	6,0	8,88	13,9	44,1	49,7	15,7	31,5	1201,0	75,5	4,5
6	6,0	7,65	13,5	40,8	53,4	17,6	33,1	1172,0	71,5	4,3
7	4,6	8,1	13,8	42,1	52,4	17,1	32,7	432,5	83,3	3,8
8	5,9	8,3	12,9	40,7	49,0	15,6	31,8	1230,0	76,8	4,5
9	5,5	8,3	13,4	42,1	50,4	16,1	31,9	984,0	82,7	4,5
10	4,3	7,9	13,1	41,5	52,3	16,5	31,6	1492,0	82,2	3,5
11	6,2	7,5	12,9	41,2	55,1	17,2	31,3	724,0	76,2	4,7
12	3,5	8,1	12,8	39,8	49,3	15,9	32,3	1660,0	79,9	2,8
Média	6,1	8,0	13,3	41,6	50,8	16,6	32,1	108,7	80,0	4,8

**GRUPO EXPOSTO – 2 HORAS**

Núm. animais	WBC	RBC	Hgb	Hct	MCV	MCH	MCHC	Plaquetas	Lymph %	Lymph #
1	5,6	7,95	13,3	42,5	43,4	17,0	31,8	117,5	83,3	3,9
2	9,8	8,29	13,5	42,0	50,2	16,0	32,1	51,3	82,2	8,5
3	7,8	7,94	13,8	41,8	51,3	16,9	33,0	145,5	79,1	6,7
4	7,0	7,84	13,4	42,4	51,4	17,2	31,8	100,7	87,8	5,6
5	6,2	8,6	12,9	42,9	49,7	15,7	31,5	120,1	79,5	4,3
6	6,5	7,5	13,5	40,8	53,4	16,8	33,1	117,2	74,1	4,3
7	4,8	8,0	13,8	42,1	52,4	17,1	32,7	87,6	82,5	3,7
8	5,4	8,4	13,2	42,0	49,0	15,6	31,8	123,0	76,8	4,5
Média	6,6	8,1	13,4	42,1	50,1	16,5	32,2	107,9	80,7	5,2

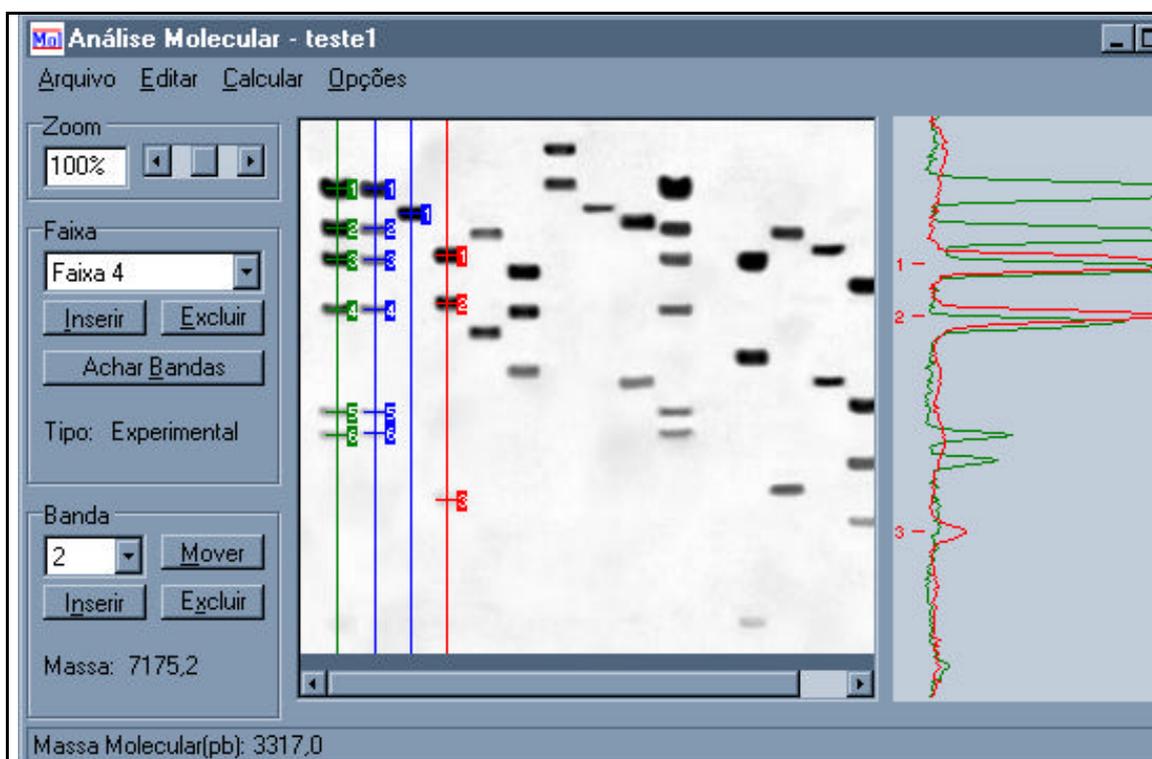
## 7.2 - ANEXO 2

### UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS

### DEPARTAMENTO DE ELETRÔNICA E SISTEMAS LABORATÓRIO DE RECONHECIMENTO DE PADRÕES

## DATA-GEL

### Sistema de Documentação de Imagens para Análises de Exames DNA/RNA por Gel Eletroforese



### Descrição

O programa Análise Molecular permite que imagens de géis de eletroforese de DNA, RNA ou proteínas sejam analisados. Sua função é determinar as massas moleculares das substâncias analisadas através da eletroforese. As massas moleculares são determinadas a partir da posição das bandas da imagem do gel submetido ao processo de eletroforese. A relação entre a posição das bandas na imagem e a massa molecular é determinada através das bandas de uma substância cujas massas moleculares já são conhecidas. Esta substância é denominada marcador.

## ***Imagem do Gel de Eletroforese***

A imagem do gel de eletroforese é formada por bandas que possuem a forma de linhas horizontais. As distâncias destas bandas em relação ao topo da imagem é função da massa molecular relativa a cada banda. As bandas estão divididas em faixas verticais, onde cada faixa é relativa à uma determinada amostra.

## ***Abrindo uma Nova Imagem para Análise***

Para analisar uma nova imagem de um gel de eletroforese utilize o comando “Novo” no menu “Arquivo” da janela principal do programa. Então selecione o arquivo que deseja abrir (extensão BMP), e a imagem armazenada no arquivo será mostrada na janela “Nova imagem”. Nesta janela você pode selecionar a região da imagem que será analisada clicando e arrastando o mouse sobre a imagem.

Você deve selecionar o tipo de fundo da imagem, que pode ser branco ou preto, clicando nos botões circulares localizados embaixo da imagem.

Caso deseje analisar a imagem como um todo, basta não selecionar nenhuma região da imagem

Para finalizar pressione o botão OK.

## ***Identificação das Faixas***

Cada faixa vertical representa uma amostra de substância que será analisada. A identificação de cada faixa é realizada pelo usuário através do botão “Inserir” do quadro “Faixa” na janela principal do programa. Ao clicar o botão inserir ele passa ao estado “pressionado”. Então basta levar o mouse até o local da imagem onde está a faixa que se deseja identificar e clicar o mouse neste local.

Ao clicar o mouse sobre a imagem será mostrada a caixa de diálogo “Nova faixa”, onde poderá ser modificado o nome da nova faixa e o seu tipo (ver Tipos de Faixa). Em seguida deve ser pressionado o botão “OK” para encerrar a criação da nova faixa, no caso da faixa tipo “Experimental”. Caso a faixa seja do tipo “Marcador”, deve-se clicar sobre o botão “Selecionar” e em seguida deve ser selecionada referência do marcador. (ver Selecionando Marcadores)

O botão “Inserir” continuará pressionado até que seja clicado novamente, ou então, até que o botão “Inserir” do quadro “Banda” seja pressionado. Enquanto o botão estiver pressionado, uma nova faixa será criada cada vez que o mouse seja clicado sobre alguma região da imagem.

## ***Tipos de Faixas***

Existem dois tipos de faixas: “Experimental” e “Marcador”.

O tipo “Experimental” representa as amostras cuja composição não é conhecida, ou seja, as amostras que estão sendo analisadas.

O tipo “Marcador” representa a substância de massas moleculares conhecidas, que servirá de referência para a análise das outras substâncias.

Só é permitida a existência de uma faixa do tipo “Marcador”, que é indicada pela linha verde (vermelha quando selecionada). As faixas experimentais são indicadas por linhas azuis (vermelha quando selecionada).

A qualquer momento uma ou nenhuma faixa pode estar selecionada. Estando selecionada, a faixa será indicada pela linha vermelha. (ver Selecionando Faixas).

### **Selecionando Faixas**

Para selecionar uma faixa você pode clicar com o mouse sobre a faixa ou selecionar a faixa pelo nome na “caixa de rolagem” do quadro “Faixa”.

Quando uma faixa estiver selecionada, o seu nome e o seu tipo aparecerão na caixa de rolagem do quadro “Faixa”. E as bandas que aparecerão no quadro “Banda” serão relativas a esta faixa.

### **Selecionando Marcadores**

Ao criar ou editar uma faixa do tipo “Marcador”, você precisa selecionar o tipo de marcador representado pela faixa. Esta seleção é feita através da janela “Marcadores”, que permite também inclusão, edição e exclusão de outros marcadores.

Outra maneira de ter acesso aos tipos de marcadores é através do item “Marcadores” do menu “Opções”.

### **Editando Faixas**

Para editar uma faixa você pode clicar com botão direito do mouse sobre a faixa, ou, com a faixa em questão selecionada, acionar o item “Editar faixa” no menu “Editar”.

### **Botão “Achar Bandas”**

Ao se pressionar o botão “Achar Bandas” no quadro “Faixa”, o programa irá identificar automaticamente as bandas presentes na faixa selecionada.

A sensibilidade da procura pode ser ajustada através do item “Sensibilidade” do menu “Opções”. Quanto maior for o valor deste parâmetro, maior deverá ser a intensidade das bandas para que sejam identificadas.

### **Sensibilidade**

Ver “Botão ‘Achar Bandas’”.

### **Excluindo Faixas**

A faixa selecionada pode ser excluída através do botão “Excluir” no quadro “Faixa” ou através do item “Excluir faixa” do menu “Editar”.

### ***Criando Bandas***

Além do uso do botão “Achar Bandas”, novas bandas podem ser criadas utilizando o botão “Inserir” do quadro “Banda”.

Clicando sobre este botão uma vez o coloca no estado “pressionado”. A partir de então novas bandas podem ser incluídas clicando sobre a faixa onde se deseja incluir a nova banda no local desejado. Para encerrar a criação de novas bandas deve-se clicar novamente sobre o botão “Inserir”.

### ***Movendo Bandas***

Para mover uma banda deve-se pressionar o botão “Mover” do quadro “Banda” até que ele fique no estado “pressionado”. Então deve-se clicar sobre o número da banda que se deseja mover com o botão esquerdo do mouse e arrastar a banda para a sua nova posição.

Dica: para obter um ajuste mais fino da posição da banda, altere o zoom da imagem para um maior grau de magnificação.

### ***Excluindo Bandas***

A banda selecionada pode ser excluída através do botão “Excluir” no quadro “Banda ou através do item “Excluir banda” do menu “Editar”.

### ***Calcular Escala***

A escala é a função que relaciona a distância de um ponto qualquer da imagem ao topo e a massa molecular referente a uma banda que se encontra no referido ponto da imagem. Esta função é obtida a partir da posição das bandas do marcador, portanto antes de se calcular a escala é necessário identificar alguma faixa como do tipo “Marcador” e localizar as bandas presentes nesta faixa.

O calculo da escala é feito quando o item “Calcular escala” do menu “Calcular” é selecionado.

Após o calculo da escala, a massa molecular referente a posição do mouse na imagem aparecerá na barra de status, na parte inferior da janela do programa. Além disso, a massa molecular da banda selecionada será mostrada no quadro “Banda”.