

**HENRIETTE RIGHI**

**Estudo de efeitos biofísicos induzidos pela  
combinação de exposição à Radiação Ionizante e  
a Campos Magnéticos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação Interunidades em  
Biotecnologia do Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São  
Paulo para a obtenção do Título de  
Doutor em Biotecnologia

São Paulo  
2020

**HENRIETTE RIGHI**

**Estudo de efeitos biofísicos induzidos pela combinação de  
exposição à Radiação Ionizante e a Campos Magnéticos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. João Dias de Toledo Arruda Neto

Versão original

São Paulo  
2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Righi, Henriette

Estudo de efeitos biofísicos induzidos pela  
combinação de exposição à Radiação Ionizante e a Campos  
Magnéticos / Henriette Righi; orientador João Dias  
de Toledo Arruda-Neto. -- São Paulo, 2020.  
83 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Efeitos biofísicos. . 2. Campo Magnético  
Estático. . 3. Radiação Ionizante. . 4. Recuperação  
celular. 5. Deinococcus radiodurans. I. Dias de  
Toledo Arruda-Neto, João, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
**Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia**  
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidata: Henriette Righi

Título da Tese: Estudo de efeitos biofísicos induzidos pela combinação de exposição à Radiação Ionizante e a Campos Magnéticos

Orientador: Prof. Dr. João Dias de Toledo Arruda Neto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

**Aprovado(a)**                       **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405  
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 731/15 referente ao projeto intitulado: "*Estudo de efeitos biológicos induzidos por Campos Magnéticos (estáticos e variáveis) - ação genotóxica e potencialização de tratamento radioterápicos*" sob a responsabilidade de **Henriette Righi**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°466 de 2012.

São Paulo, 24 de março de 2015.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO  
Coordenador da CEPsh - ICB/USP



Dedico este trabalho à Maria Aparecida Amorim, minha primeira e eterna professora.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, e grande amigo João Dias de Toledo Arruda Neto. Obrigada por estar presente, como um presente, desde meu primeiro ano de graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT.

Aos meus colaboradores, que me guiaram pela mão nos caminhos da Biologia, à Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva e ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez.

Aos meus companheiros de pesquisa em especial à Guacyara Tenório, à Aline Caroline, ao Pedro e a todos do Laboratório de Microbiologia do ICB, que me auxiliaram pelas noites adentro de trabalho.

À Beth, pela paciência infinita nas prolongadas horas de irradiações no IPEN.

Ao Prof. Dr. Joaquim Machado, você expandiu meu universo até pontos incoerentes da Biotecnologia.

À minha amada mãe Maria Aparecida Amorim, por me ensinar a olhar de forma curiosa e investigativa o Universo. Por acreditar todos os dias nesse sonho que se tornou realidade.

Ao meu amado companheiro José Luís Nami Adum Ortega, por colorir mais que meus desenhos, minha vida. E me proporcionar horas de nutritivas discussões sobre a Ciência.

Ao meu filho Tito Righi Ortega, que já faz experimentos e me ensina mais a cada dia.

À minha amiga Talita Raquel Luz Romero e sua família incrível. Sua presença na minha vida é de tamanha relevância que as palavras não alcançam seu significado.

Ao meu amigo e parceiro na bancada da vida Evandro Drigo da Silva, seu apoio e ensinamentos possibilitaram concluir mais esta etapa.

Aos meus amigos de trabalho dos Planetários de São Paulo, especialmente ao meu diretor João Fonseca que apoiou e permitiu minha dedicação acadêmica.

Enfim a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada por tudo

*Pensaram que eu era surrealista, mas nunca fui.  
Nunca pintei sonhos, só pintei minha a própria realidade.*  
(Frida Kahlo)

## RESUMO

RIGHI, Henriette. **Estudo de efeitos biofísicos induzidos pela combinação de exposição à Radiação Ionizante e a Campos Magnéticos**, 83. Tese (Doutorado) – São Paulo: Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, 2020.

Campos Magnéticos de moderadas intensidades eficientemente provocam alterações em sistemas biológicos. Resultados obtidos neste Laboratório com células expostas a gamas e a Campos Elétricos Estáticos (CEE), indicaram ser este um eficiente radiosensibilizador. Um CEE de 200V provocou drástica redução no ombro de reparo da *D. radiodurans*. Questões não respondidas, referentes à ação de Campos Magnéticos Estáticos (CME): (1) indução de efeitos biofísicos em *células íntegras*, e (2) interferência na viabilidade de *células irradiadas*. *D. radiodurans*, a espécie mais resistente à radiação ionizante, foi irradiada com gamas entre 0.5 e 13 kGy, no Instituto de Pesquisas Nucleares (IPEN), e imediatamente submetida aos CMEs de 0,08 T e 0,8 T. *E. coli* foi utilizada como controle negativo. Principais conclusões: (a) a exposição de células de *D. radiodurans* a altas doses de radiação e em seguida a CMEs, aumenta sua viabilidade; (b) a recuperação das células irradiadas é proporcional à intensidade do CME; (c) o processo de recuperação celular (aumento da viabilidade) é estocástico.

**Palavras-chave:** Efeitos biofísicos. Campo Magnético Estático. Radiação Ionizante. Recuperação celular. *Deinococcus radiodurans*.

## ABSTRACT

RIGHI, Henriette. **Study of biophysical effects induced by the combination of exposure to Ionizing Radiation and Magnetic Fields**, 83. Thesis (PhD) – São Paulo: Interunit Postgraduate Program in Biotechnology USP / Institute Butantan/IPT, 2020.

Moderate intensities Magnetic Fields induce changes in biologic systems. Results from this Laboratory with cells exposed to both gammas and Static Electric Fields (SEF), indicates this agent as an efficient radiosensitizer. A 200V SEF caused accentuated depletion of *D. radiodurans* repair shoulder. Unanswered questions related to the role of Static Magnetic Fields (SMF) are: (1) induction of biophysical effects in whole cells, and (2) interference effects in irradiated cells viability. *D. radiodurans*, a resistant species to ionizing radiation, was exposed to gammas between 0.5 and 13 kGy, at the Nuclear Research Institute (IPEN), and immediately after exposed to SMFs of 0.08 T and 0.8 T. *E. coli* was employed as negative control. Mainly conclusions are: (a) exposure of *D. radiodurans* cells to both high doses of radiation and SMF increases its viability; (b) the viability recuperation of irradiated cells is proportional to the SMF intensity; (c) the cell recuperation process (viability increase) is stochastic.

**Key words:** Biophysical effects. Static Magnetic Fields. Ionizing Radiation. Cell recuperation. *Deinococcus radiodurans*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Processo de reconhecimento de uma Dupla Quebra de Fita.....	20
<b>Figura 2</b> - Movimentação eletrônica.....	23
<b>Figura 3</b> - Imagens mostrando a forma celular e modificações da superfície celular de células U937 após exposição por 24h a um CME de 6 mT.....	29
<b>Figura 4</b> - Células U937 apoptóticas induzidas a apoptose por exposição a um CME.....	30
<b>Figura 5</b> - Descrição do modelo atômico planetário.....	31
<b>Figura 6</b> - Espectro eletromagnético mostrando os comprimentos de onda (m) e frequência (Hz). ....	33
<b>Figura 7</b> - Cinemática do efeito fotoelétrico.....	34
<b>Figura 8</b> - A interação Compton. ....	34
<b>Figura 9</b> - O processo de produção de pares (materialização).....	36
<b>Figura 10</b> - Linear Energy Transfer (LET).....	36
<b>Figura 11</b> - Esquema ilustrativo do decaimento beta do Cobalto 60.....	37
<b>Figura 12</b> - Ilustração das três etapas do DCI.....	37
<b>Figura 13</b> - Ilustrações das quebras simples e duplas das fitas do DNA pela radiação ionizante.....	39
<b>Figura 14</b> - Resultados normalizados dos tamanhos de fragmentos de plasmídeos. ....	40
<b>Figura 15</b> - <i>Deinococcus radiodurans</i> . ....	42
<b>Figura 16</b> - Curvas de sobrevivência da bactéria <i>D. radiodurans</i> : (a) aos raios gamas; (b) a dessecação.....	44
<b>Figura 17</b> - Esquema ilustrativo da preparação das amostras líquidas. ....	48
<b>Figura 18</b> - Esquema ilustrativo da diluição seriada.....	49
<b>Figura 19</b> - Esquema ilustrativo da metodologia para a determinação da curva de crescimento, das bactérias <i>D.radiodurans</i> e <i>E. Coli</i> . ....	50
<b>Figura 20</b> - Esquema ilustrativo do projeto do equipamento - descrição das dimensões do equipamento.....	52
<b>Figura 21</b> - Esquema ilustrativo da obtenção do CME e CMV: no equipamento construído; e no eletroímã. ....	53
<b>Figura 22</b> - Esquema ilustrativo da exposição das amostras ao CME do equipamento .....54	
<b>Figura 23</b> - Esquema ilustrativo da exposição das amostras ao CME do eletroímã.....	55

<b>Figura 24</b> - Foto da Gamma Cell alocada no IPEN .....	57
<b>Figura 25</b> - Foto do equipamento construído.....	59
<b>Figura 26</b> - Curvas de crescimento em função do tempo para as bactérias <i>D.radiodurans</i> e <i>E.coli</i> .....	59
<b>Figura 27</b> - Curva de crescimento em função do tempo para a bactéria <i>D.radiodurans</i> .....	60
<b>Figura 28</b> - Curva de crescimento em função do tempo para a bactéria <i>E.coli</i> .....	60
<b>Figura 29</b> - Gráfico da porcentagem da viabilidade bacteriana da <i>E.coli</i> sob ação de CME em função do tempo.....	61
<b>Figura 30</b> - Curva de viabilidade da <i>E. coli</i> em função da dose (kGy).....	62
<b>Figura 31</b> - Curva de viabilidade de <i>D.radiodurans</i> no meio de cultivo M1, em função da dose (kGy).....	63
<b>Figura 32</b> - Curva de viabilidade de <i>D.radiodurans</i> no meio de cultivo M2, em função da dose (kGy).....	63
<b>Figura 33</b> - Coeficiente de recuperação celular para B=0,8T .....	65
<b>Figura 34</b> - Coeficiente de recuperação celular para B=0,08T .....	65
<b>Figura 35</b> - Valores médios dos coeficientes de recuperação celular.....	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Efeitos Biológicos Específicos em diferentes estruturas e funções celulares.....	26
<b>Tabela 2</b> - Valores do LET para alguns tipos de radiação e energia em água. ....	37
<b>Tabela 3</b> - Intervalo de dose associada à morte em seres humanos e na bactéria <i>D. radiodurans</i> , expostos uniformemente a uma dose aguda de radiação de baixo LET. ....	40
<b>Tabela 4</b> - Composição do meio TGY .....	47
<b>Tabela 5</b> - Composição do meio LB .....	47
<b>Tabela 6</b> - Condições de cultivo de linhagens bacterianas.....	48
<b>Tabela 7</b> - Resultados das medições em 9 pontos diferentes na área central do equipamento, com a média dos valores (tesla-T) e o desvio padrão .....	54
<b>Tabela 8</b> - Resultados das medições em 9 pontos diferentes na área central do eletroímã, com a média dos valores (tesla-T) e o desvio padrão. ....	56
<b>Tabela 9</b> - Características médias da Gamma-Cell. ....	57
<b>Tabela 10</b> - Dados da função de sobrevivência média da <i>D. radiodurans</i> .....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT	par de base s componentes de DNA: Adenina e Timina
CEE	Campo Elétrico Estático
CM	Campo Magnético
CME	Campo Magnético Estático
CMV	Campo Magnético Variável
CRC	Coefficiente de Recuperação Celular
DCI	Decaimento coulombiano interatômico ou intermolecular
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO <sub>600</sub>	Densidade ótica em 600nm
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
QSF	Quebras Simples de Fita -DNA
QDF	Quebras Duplas de Fitas- DNA

## GLOSSÁRIO DE UNIDADES

$\mu L$	microlitro
$g$	grama
$Gy$	unidade de dose de radiação – Gray
$Kb$	quilobase
$Kpb$	quilo pares de base
$kGy$	unidade de dose de radiação – kilogray
$mL$	mililitro
$mm$	milímetro
$mT$	mili tesla
$nm$	nanômetro
$pb$	pares de base
$rpm$	rotações por minuto
$T$	Tesla

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1</b> - Força Magnética.....	22
<b>Equação 2</b> - Força Centrípeta.....	22
<b>Equação 3</b> - Relação entre velocidade linear e angular.....	22
<b>Equação 4</b> - Raio da trajetória em relação ao Campo Magnético Estático.....	23
<b>Equação 5</b> -Terceira Lei de Maxwell na forma diferencial.....	24
<b>Equação 6</b> -Terceira Lei de Maxwell na forma integral.....	24
<b>Equação 7</b> - Lei de Lenz.....	24
<b>Equação 8</b> - Energia Cinética do elétron emitido.....	33
<b>Equação 9</b> - Energia final do fóton espalhado.....	35
<b>Equação 10</b> - Linear Energy Transfer (LET).....	36
<b>Equação 11</b> - Viabilidade Celular.....	51
<b>Equação 12</b> - Coeficiente de Recuperação Celular.....	64
<b>Equação 13</b> -Torque realizado pela Força Magnética.....	67
<b>Equação 14</b> - Aceleração Angular Resultante do Torque.....	67
<b>Equação 15</b> - Coeficiente de Recuperação Celular R(D).....	71
<b>Equação 16</b> - Função de Sobrevivência.....	71
<b>Equação 17</b> - Coeficiente de Recuperação Celular R(D) Ajustado.....	71
<b>Equação 18</b> - Parâmetros $R_0$ e $\lambda$ para CME ( $B=0,8T$ ).....	71
<b>Equação 19</b> - Coeficiente de Recuperação Celular R(D) ajustado nos parâmetros $R_0$ e $\lambda$ para CME ( $B=0,8T$ ).....	71
<b>Equação 20</b> - Parâmetros $R_0$ e $\lambda$ para CME ( $B=0,08T$ ).....	72
<b>Equação 21</b> - Coeficiente de Recuperação Celular R(D) ajustado nos parâmetros $R_0$ e $\lambda$ para CME ( $B=0,08T$ ).....	72
<b>Equação 22</b> - Probabilidade relativa $\lambda$ no Espaço-de-Fase.....	72

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1 INTERAÇÕES DE CAMPOS ELÉTRICOS E MAGNÉTICOS COM A MATÉRIA .....	19
1.1.1 Campo Elétrico Estático (CEE).....	20
1.1.2 Campo Magnético Estático (CME).....	22
1.1.3 A interdependência entre os efeitos elétrico e magnético .....	24
1.2 CAMPOS MAGNÉTICOS DE MODERADA INTENSIDADE – EFEITOS BIOLÓGICOS .....	25
1.2.1 Exemplos representativos dos Efeitos Específicos: CMs de Moderada Intensidade .....	25
1.3 DIAMAGNETISMO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS .....	31
1.4 ASPECTOS DA RADIAÇÃO .....	32
1.5 DANOS RADIOBIOLÓGICOS .....	38
1.6 MODELOS BIOLÓGICOS – BACTÉRIAS EXTREMÓFILAS .....	41
1.4.1 A bactéria <i>Deinococcus radiodurans</i> .....	42
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>46</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	46
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	46
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
3.1 MICRORGANISMOS .....	47
3.2 MEIOS DE CULTURA .....	47
3.3 ESTERILIZAÇÃO.....	47
3.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	48
3.5 PRESERVAÇÃO DE BACTÉRIAS.....	48
3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS: .....	48
3.7 CURVAS DE CRESCIMENTO .....	50
3.8 VIABILIDADE CELULAR .....	50
3.9 EXPOSIÇÃO A CAMPOS MAGNÉTICOS .....	51
3.9.1 Design experimental para o dispositivo de exposição ao Campo Magnético Estático.....	51
3.9.2 Medição da intensidade dos Campos Magnéticos Estáticos. ....	53
3.9.2.1 Medição da intensidade do Campo Magnético Estático produzido pelo equipamento desenvolvido. ....	53
3.9.2.2 Medição da intensidade do Campo Magnético Estático produzido pelo eletroímã.....	55
3.10 RADIAÇÃO GAMA.....	57
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
4.1 EQUIPAMENTO.....	59

4.3 VIABILIDADE.....	61
4.4 EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO GAMA E CME.....	62
4.5 CÉLULAS IRRADIADAS E EXPOSTAS A CME – FUNÇÕES DE SOBREVIVÊNCIA.....	64
4.6 COEFICIENTE DE RECUPERAÇÃO CELULAR .....	66
4.7 RESULTADOS DO CONTROLE NEGATIVO ( <i>E. COLI</i> ) .....	67
4.8 FUNDAMENTOS TEÓRICOS <i>AD-HOC</i> .....	67
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
5.1 A RACIONALIDADE DOS RESULTADOS OBTIDOS .....	68
5.1.1 <i>Conceitos de apoio</i> .....	68
5.1.2 <i>Interpretação física da Reabilitação Celular</i> .....	69
5.2 REVELANDO A NATUREZA <i>ESTOCÁSTICA</i> DOS RESULTADOS PARA R(D).....	71
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS DE RELEVÂNCIA.....</b>	<b>74</b>
7.1 CAMPOS MAGNÉTICOS ENDÓGENOS E EXÓGENOS .....	74
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>
<b>APÊNDICE A- VELOCIDADE DO FRAGMENTO .....</b>	<b>78</b>
<b>APÊNDICE B- PROBABILIDADE NO ESPAÇO DE FASE.....</b>	<b>79</b>
<b>APÊNDICE C- DADOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>80</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os estudos dos campos magnéticos, ao longo da história humana, podem ser divididos em duas vertentes: uma factual, em que as investigações de suas características ocorridas, provavelmente, há cerca de três mil anos, quando são encontrados os primeiros minerais magnetizados; e outra, em que se estuda sua interação com a matéria. Diversos modelos dos fenômenos observados foram propostos e testados ao longo do tempo. Hoje, o estudo da interação do campo magnético com a matéria viva pode ser exemplificado nas aplicações em medicina diagnóstica, na terapia celular e na recuperação de ossos lesionados.

Estamos expostos a agentes físicos exógenos como o campo gravitacional (de intensidade muito débil em nível molecular), campo eletromagnético (elétrico e magnético), radiações não ionizantes e ionizantes, entre outros. Uma vez que os seres vivos e não vivos são constituídos por cargas elétricas, átomos e moléculas, a *interação primária* com agentes físicos exógenos dar-se-á por esses constituintes.

Embora *forças elétricas* sejam bilhões de vezes mais intensas do que a *força gravitacional*, a razão pela qual não se observa, cotidianamente, essa enorme intensidade deve-se ao fato de que corpos macroscópicos estão, em geral, em equilíbrio de cargas. Entretanto, quando a escala é reduzida às pequenas porções da matéria, como arranjos de poucos átomos, é possível observar a intensidade das forças elétricas.

Aspectos e questões atuais referentes à ação de agentes físicos exógenos (campos elétricos e magnéticos) em: (1) *células integras*, quanto à indução de efeitos biofísicos, e em (2) *células irradiadas*, quanto à interferência na viabilidade destas, serão tratados e discutidos a seguir.

### 1.1 INTERAÇÕES DE CAMPOS ELÉTRICOS E MAGNÉTICOS COM A MATÉRIA

Os campos elétrico e magnético são campos em que suas interações dependem da carga e ou do movimento do objeto de estudo.

### 1.1.1 Campo Elétrico Estático (CEE)

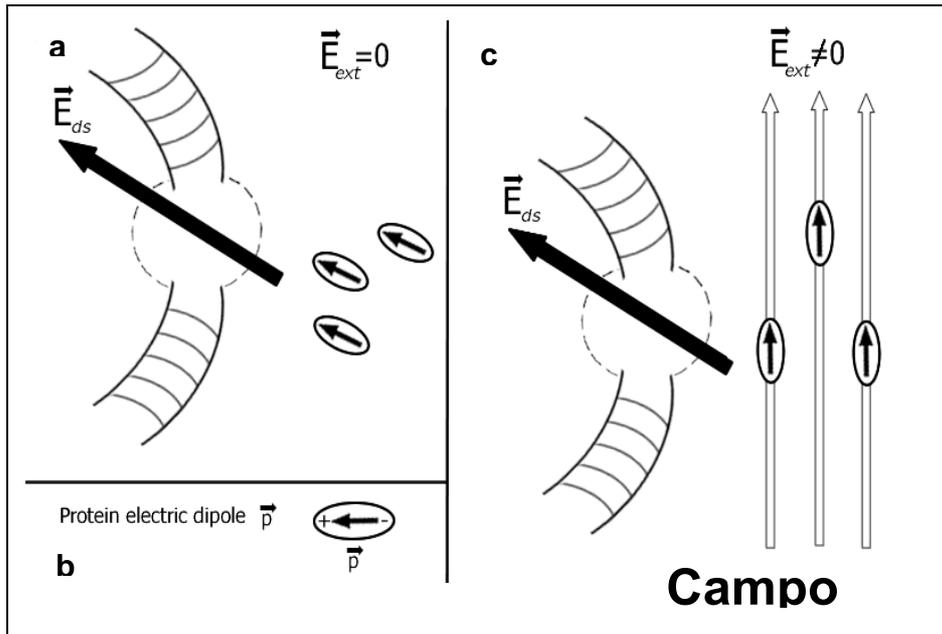
O Campo Elétrico de uma carga em uma dada região do espaço é radial, ou seja, suas linhas de força convergem para a carga. A manifestação desse campo elétrico é percebida por outra carga situada nas proximidades, pela ação da força elétrica. Portanto, essa “outra carga” será compelida a movimentar-se retilineamente ao longo da direção radial.

Caso essas cargas se movimentem uma em relação à outra, à força elétrica de interação estática será adicionada uma **força eletrostática residual** originada de efeitos relativísticos associados à contração do espaço. Esse efeito relativístico é quantificado pelas Transformações de Lorentz-Einstein. Essa força residual é a “conhecida” Força Magnética” (OREAR, 1967).

As atividades fundamentais dos sistemas biológicos dependem de interações elétricas, como o fluxo de íons pela membrana que forma campos elétricos, divisão e migração, mecanismo mitótico e processos intercelulares que podem ser alterados na presença de um campo elétrico estático externo.

Exemplos biológicos notórios de corpos microscópicos carregados, e movimentando-se sob a ação de Campos Elétricos Estáticos, são os pequenos fragmentos produzidos pela exposição de DNA a altas doses de radiações ionizantes (ARRUDA-NETO *et al.*, 2014) Conforme ilustrado na Figura 1 (a), um CEE “polariza” o movimento de todas as partículas carregadas ao longo de sua linha de ação (direção da força elétrica).

Figura 1: (a) Representação pictórica do processo de reconhecimento de uma quebra dupla de fita (QDF) por proteínas de reparo. Usualmente, essas proteínas possuem grandes momentos de dipolo (representado em b com mais detalhes), que se orientam na direção do sítio danificado pela ação de um campo elétrico estático e endógeno, campo esse produzido pelo desequilíbrio de cargas elétricas na dupla fita danificada. (c) um campo elétrico externo mais intenso do que reorientaria o deslocamento das proteínas de reparo ao longo de sua direção impedindo, assim, a consecução do reparo.



Fonte: Arruda-Neto *et al.*, 2009.

No caso de moléculas polares em movimento (*motores moleculares*), como as enzimas de reparo de DNA [Figura 1 (b)], um CEE suficientemente intenso induziria o movimento desses *motores moleculares* ao longo da linha de ação do campo elétrico, bem como o movimento das proteínas recrutadas [Figura 1 (c)]. Essa circunstância impediria o seu *harboring* no *site* danificado, não ocorrendo, em consequência, a efetivação do reparo. Essa possibilidade foi confirmada pelo nosso laboratório em um experimento com a cepa MRC5 de células pulmonares. Seguindo a exposição à radiação gama e CCE, observou-se que o número dos  $\gamma$ -H2AX *foci* foi 40% maior nas células apenas irradiadas, uma convincente indicação de que o processo de reparo do DNA foi parcialmente inativado (ARRUDA-NETO *et al.*, 2009).

Resultados experimentais obtidos com procariotos e eucariotos, expostos à radiação gama e a CEE, indicaram ser esse agente físico exógeno um eficiente radiosensibilizador. Surpreendentemente, o mais alto desempenho de **radiossensibilização** do CEE foi obtido com a *Deinococcus radiodurans*, o mais radiorresistente dos organismos estudados (PRADO, G. R. 2011). De fato, quando atuando em *D. radiodurans* pós-irradiação, o CEE provocou uma drástica redução do ombro de reparo entre 4 e 8 kGy (ARRUDA-NETO *et al.* 2014).

Os Campos Elétricos também atuaram como quimiossensibilizadores. Estudos conduzidos pelo Grupo revelaram uma acentuada atuação dos CEE na **sensibilização** de tratamentos quimioterápicos. Nesse caso, observou-se uma drástica redução da viabilidade celular de melanoma (em ratos) quando o tratamento quimioterápico com Etoposídeo foi

realizado concomitantemente à exposição das células a Campos Elétricos Estáticos (ANDRETTE, R.O. 2012).

Todas essas características intrigantes dos Campos Elétricos Estáticos motivou o estudo de um Agente Físico Exógeno complementar ao efeito elétrico: **Campos Magnéticos Estáticos**.

### 1.1.2 Campo Magnético Estático (CME)

O efeito magnético já era conhecido e descrito pelos filósofos gregos na Antiguidade. Contudo, somente em 1269 D.C., os polos de um ímã foram pela primeira vez identificados e descritos.

A existência de uma Força Magnética pressupõe a existência de um Campo Magnético. Assim, a interação magnética somente se dá por meio de um corpo carregado em movimento. Portanto, campos elétricos e magnéticos são faces da mesma moeda (FEYNMAN; LEIGHTON; SANDS, 2008). Considerando-se, por exemplo, que uma partícula carregada ( $q$ ) adentre na área de ação do campo magnético estático  $\vec{B}$ , a força magnética é dada por:

Equação 1- Força Magnética.

$$\vec{F}_m = q\vec{v} \times \vec{B} \quad (1)$$

em que  $\vec{v}$  é a velocidade vetorial da partícula. A trajetória da partícula carregada no CME é circular, isto é, a força magnética é perpendicular ao CME, resultando na rotação do corpo carregado. Assim, a força centrípeta é dada:

Equação 2 - Força Centrípeta.

$$F = m \cdot \frac{v^2}{r} \quad (2)$$

e a relação entre a velocidade tangencial e a velocidade angular é dada por:

Equação 3- Relação entre velocidade linear e angular.

$$v = \omega \cdot r \quad (3)$$

Consequentemente:

Equação 4 - Raio da trajetória em relação ao Campo Magnético Estático.

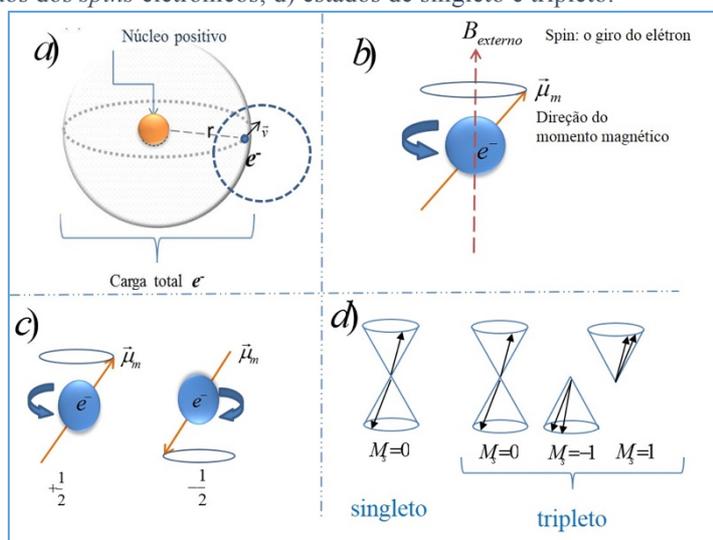
$$r = \frac{mv}{qB} \quad (4)$$

em que o raio é inversamente proporcional ao CME, isto é, quanto maior o CME externo, menor o raio da trajetória do corpo carregado na área de ação do CME.

A formação do Campo Magnético permanente em materiais como os ferrimagnéticos (exemplo: ferrites e magnetites) foi corretamente relacionada ao Momento Magnético resultante de sua estrutura atômica. Como os elétrons estão em movimento em torno do núcleo, esse Momento Magnético resultante é gerado pelo conjunto dos *momentos magnéticos dipolares* de cada elétron orbital (Figura 2 (a) e (b)).

Assim, a interação de um Campo Magnético Estático com a matéria dependerá de sua estrutura atômica. De acordo com a configuração de seus Momentos Magnéticos, os materiais, quando expostos a um Campo Magnético Externo, são classificados em três categorias: paramagnéticos, ferromagnéticos e diamagnéticos. Em materiais como os ferromagnéticos, o somatório de seus momentos magnéticos é diferente de zero, resultando em um momento magnético permanente.

Figura 2 - movimentação eletrônica; a) representação do movimento do elétron num átomo de hidrogênio; b) detalhe do movimento do elétron, o vetor momento magnético relacionado a esse movimento; c) valores quantizados dos *spins* eletrônicos; d) estados de singleto e tripleto.



Fonte: elaborado pela Autora

As Energias de Interação ( $U$ ) de Campos Magnéticos ( $\vec{B}$ ) com Momentos Magnéticos **moleculares** ( $\vec{\mu}$ ), e dadas por  $U = \vec{\mu} \cdot \vec{B}$ , são pequenas em nível quântico, levando à degenerescência dos níveis de momento magnético atômicos. Essa circunstância é o cerne dos

processos biofísicos induzidos por momentos magnéticos (DINI; ABBRO, 2005) (ROSEN, 2003).

### 1.1.3 A interdependência entre os efeitos elétrico e magnético

A variação temporal do campo magnético (expressa por  $\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}$ ) induz um campo elétrico. O campo elétrico induzido em um circuito é equivalente a uma diferença de potencial denominada força eletromotriz induzida (*fem*) que, por sua vez, gera corrente elétrica (FEYNMAN; LEIGHTON; SANDS, 2008). A lei geral que relaciona o Campo Magnético Variável com o campo elétrico induzido corresponde à Terceira Lei de Maxwell, ou seja:

Equação 5 - Terceira Lei de Maxwell na forma diferencial.

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = - \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (5)$$

Essa lei foi proposta na forma diferencial por Maxwell, mas foi empiricamente descoberta por Faraday na forma Integral. A relação entre essas duas formulações pode ser unificada por meio do teorema de Stokes:

Equação 6 - Terceira Lei de Maxwell na forma Integral.

$$\oint_{\Gamma} \vec{E} \cdot d\vec{s} = \int_S (\vec{\nabla} \times \vec{E}) \cdot \hat{n} da = - \int_S \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \cdot \hat{n} da \quad (6)$$

em que  $\Gamma$  é uma curva fechada qualquer e  $S$  é a superfície limitada por  $\Gamma$ ; logo,

Equação 7 - Lei de Lenz.

$$\oint_{\Gamma} \vec{E} \cdot d\vec{s} = \begin{cases} - \frac{\partial}{\partial t} \int_S \vec{B} \cdot \hat{n} da \\ - \frac{\partial}{\partial t} (\text{fluxo através de } S) \end{cases} \quad (7)$$

Concluí-se que existe um campo elétrico  $\vec{E}$  se um campo magnético estiver variando no tempo. Esses efeitos são independentes, mas a *fem* é sempre igual à taxa de variação do fluxo magnético através da superfície  $S$ .

## 1.2 CAMPOS MAGNÉTICOS DE MODERADA INTENSIDADE – EFEITOS BIOLÓGICOS

A elucidação da interação dos campos magnéticos estáticos com os sistemas biológicos, em base celular e molecular, ajudaria a aprimorar o debate e estabelecer abordagens experimentais apropriadas para determinar o real potencial (positivo ou negativo) da exposição ao campo magnético. Assim, com a expansão do uso de eletrônicos em nosso dia a dia elevou-se também a exposição de seres vivos a Campos Exógenos (Magnético, Elétrico, estáticos e variáveis). Esses campos assim produzidos tornam de grande importância estudos sobre os possíveis e prováveis **efeitos biológicos decorrentes**. As propriedades e características desses efeitos dependem fortemente das intensidades dos Campos Magnéticos Estáticos e da duração da exposição.

Dini e Abbro (2005) propuseram a classificação desses campos de acordo com as intensidades: (a) **fraca**:  $< 1\text{mT}$ , (b) **moderada**:  $1\text{mT} - 1\text{T}$ , (c) **forte** =  $1\text{T} - 5\text{T}$  e (d) **ultraforte**  $> 5\text{T}$ .

Inúmeras e diversificadas **respostas biológicas não específicas** têm sido observadas quando da exposição a **campos magnéticos muito débeis** (intensidades até  $0,1\text{mT}$ ). A maioria dos resultados ocorre por interações de Campos Magnéticos com Momentos Magnéticos de macromoléculas que executam rotações.

As intensidades dos Campos Magnéticos tratadas neste trabalho,  $0,08\text{T}$  e  $0,8\text{T}$  (ou,  $80\text{mT}$  e  $0,8\text{T}$ ), inserem-se, portanto, na categoria de **moderada intensidade**. Essas intensidades chegam a ser até **oito ordens** de grandeza maiores do que aquelas associadas às **respostas biológicas não específicas**. Por um lado, as correspondentes energias de interação seriam também ordens de grandeza maiores do que o espaçamento entre níveis de momentos magnéticos, o que elimina, portanto, qualquer influência advinda da **escala quântica**. Por outro lado, Campos Magnéticos de **grande intensidade** percebem propriedades físicas globais das macromoléculas, tais como movimento e distribuições de cargas.

### 1.2.1 Exemplos representativos dos Efeitos Específicos: CMs de Moderada Intensidade

Os estudos dos efeitos dos Campos Magnéticos Estáticos de moderada intensidade em sistemas biológicos apresentam alterações em diferentes estruturas e funções celulares. Uma resenha elaborada por Dini *et al.* (2005) ressalta os efeitos de CME na morfologia da célula, esta vinculada à estrutura molecular do citoesqueleto, à expressão da membrana plasmática, assim como aos resíduos de carbono (Tabela 1).

Tabela 1- Efeitos biológicos específicos em diferentes estruturas e funções celulares.

<b>Estruturas e funções celulares</b>	<b>Efeitos</b>
Membrana plasmática	<ul style="list-style-type: none"> <li>–Orientação de domínios moleculares diamagnéticos</li> <li>–Mudanças proteicas</li> <li>–Rotação dos fosfolipídios da membrana</li> <li>–Arranjo dos sítios de ligação da lectina</li> </ul>
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>–Fluxos intracelulares e extracelulares</li> <li>–Transporte através da membrana celular</li> <li>–Sinalização por Ca<sup>2+</sup></li> </ul>
Forma da célula	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Alongamento de células em crescimento em suspensão</li> <li>–Separação de células aderidas em crescimento</li> <li>– Microvilosidade lamelar ou semelhante a bolhas</li> </ul>
Citoesqueleto	<ul style="list-style-type: none"> <li>–Organização e decomposição dos filamentos e microtúbulos de F-actina</li> </ul>
Apoptose	<ul style="list-style-type: none"> <li>–Perturbação da taxa apoptótica (aumenta ou diminui)</li> </ul>
Proliferação	<ul style="list-style-type: none"> <li>–Perturbação do índice proliferativo (aumento ou diminuição)</li> </ul>
Necrose	<ul style="list-style-type: none"> <li>–Não induzida</li> </ul>

Estruturas e funções celulares	Efeitos
Genes relacionados à apoptose	–Modulação (aumenta ou diminui)
Superfície celular apoptótica	- Parcialmente reverte a expressão de epítomos <i>eat me</i>
Fagocitose de células apoptóticas	–Diminuída
Diferenciação de macrófagos	– Atrasada

Fonte: adaptado de Dini e Abbro (2005).

Como descrito na Tabela 1, os efeitos dos CME estão presentes em diversas estruturas celulares como também em sua dinâmica. Esses efeitos estão ligados às especificidades físico-químicas dessas estruturas (ROSEN, 2003). No caso, devido às propriedades diamagnéticas globais do arranjo das macromoléculas constituintes das membranas fosfolipídicas, ação de CMEs induzem alterações de forma e tamanho (MIHOUB *et al.*, 2012).

A estrutura geral da membrana citoplasmática corresponde a uma bicamada fosfolipídica. Os fosfolipídios, um tipo de lipídio, que são formados por componentes hidrofóbicos (ácidos graxos) apolares e hidrofílicos (grupo dos fosfatos) polares, organizam-se formando estruturas em bicamadas. O conteúdo proteico da membrana citoplasmática é bastante elevado, e as proteínas de membrana normalmente apresentam superfícies hidrofóbicas nas regiões que atravessam a membrana, e superfícies hidrofílicas nas regiões que estabelecem contato com o ambiente e com o citoplasma (MARDIGAN *et al.*, 2016). Esta configuração permite a formação de uma barreira fluida e dinâmica como um mosaico de lipídeos e proteínas.

A membrana citoplasmática desempenha várias funções, tais como uma barreira de permeabilidade impedindo o extravasamento passivo de substâncias para dentro ou para fora

da célula. É o sítio de ancoragem para muitas proteínas responsáveis pela conservação de energia e transporte de substâncias para dentro e fora da célula.

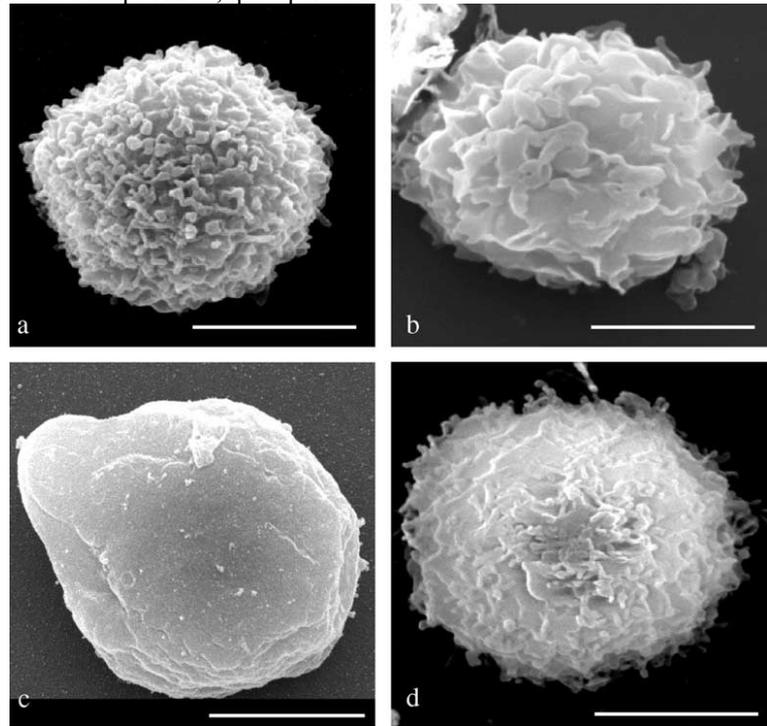
Além de seu papel estrutural, essas moléculas podem desempenhar processos sinalizadores, como no caso da apoptose, controlar o fluxo de íons da célula e reconhecer sinais externos pelos receptores espalhados por sua trama. Também é um local de conservação de energia na célula procariótica (MARDIGAN *et al.*, 2016). A membrana pode existir em uma forma energética carregada em que os prótons ( $H^+$ ) são separados dos íons hidroxil ( $OH^-$ ) por meio de sua superfície. Essa fonte de energia, denominada *força próton-motiva*, é responsável pela realização de muitas atividades celulares que requerem energia.

Outro ponto relevante na dinâmica de células procarióticas é seu citoplasma, que mantém uma concentração elevada de solutos dissolvidos, o que cria uma significativa pressão osmótica – cerca de 2atm em uma célula típica. Para resistir a essa pressão e evitar uma explosão (lise celular), a maioria das células de bactérias possui paredes celulares. O entendimento da estrutura e da função da membrana e da parede celular é importante na elucidação dos efeitos dos CME, dado que o efeito na membrana celular é o mais recorrente na literatura.

Segundo Dini e Abbro (2005), o CME de moderada intensidade pode afetar a rotação das moléculas fosfolipídicas por possuírem propriedades diamagnéticas (ROSEN, 2003). Os resultados apresentados indicam dependência com o tempo de exposição ao CME, como no caso das microvilosidades. Nesse experimento, verificou-se que um CME de **6mT** aplicado por 24horas em células isoladas de linfoma humano (U937) resultou na variação do número e forma das microvilosidades (Figura 3). Alterações de fluxo  $Ca^{2+}$  causam direta ou indiretamente cascatas de processos de reorganização dos microfilamentos e elementos do citoesqueleto, levando também à mudança na forma da superfície celular.

Ainda em Dini e Abbro (2005), resultados muito detalhados e informativos com relação (1) à diminuição da taxa apoptótica [de fato, CMEs interferem no fluxo dos canais de  $Ca^{2+}$  alterando a expressão *eat me*]; (2) diminuição da fagocitose das células em apoptose; (3) mudanças nas concentrações de  $Ca^{2+}$  nos fluxos intra e extracelulares; e (4) alterações no transporte através da membrana e na sinalização de cálcio. Ainda constataram alterações na forma e no citoesqueleto da célula. Contudo, assim como o resultado sobre a taxa de apoptose foi inconclusivo, outras questões, como a apoptose relacionada às alterações na modulação dos genes e alteração na proliferação, apresentaram resultados conflitantes.

Figura 3 - MEV (SEM) e microimagens confocais mostrando forma celular e modificações da superfície celular de células U937 após exposição por 24h a um CME (SMF) de 6 mT e tratamento apoptótico na presença ou na ausência de CME (SMF) de 6 mT. **(a-d)**. (a) Os controles das células U937 são caracterizados por uma forma esférica com inúmeras microvilosidades i aleatoriamente distribuídos pela superfície celular. (b) Observa-se uma drástica remodelação da forma das microvilosidades e uma pequena elongação da forma celular após exposição contínua por 24h a um CME de 6 mT..(c) Células U937 apoptóticas levemente arredondas sem microvilosidades após tratamento por 24h com cycloheximide 10K2 M. (d) A presença de um CME durante o tratamento apoptogênico modifica dramaticamente a morfologia canônica de células apoptóticas: a forma ainda é esférica, mas inúmeros microvilosidades lamelares cobrem a superfície celular. As células foram examinadas com um microscópio de varredura Philips XL50, que opera a 20 KV.

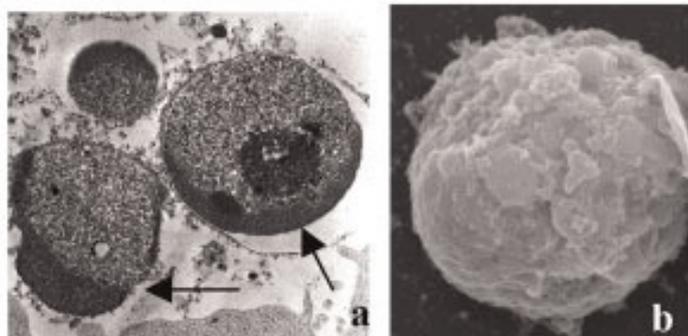


Fonte: adaptado de Dini e Abbro (2005)

Em outro estudo na **faixa de intensidade moderada**, Tenuzzo *et al.* (2006) realizaram um estudo na mesma faixa de CME e diferentes tipos de células eucariotas com foco na apoptose induzida pela ação do CME. No experimento, algumas drogas apoptóticas foram utilizadas a fim de observar a modulação da taxa apoptótica sob a ação de CME de **6mT**. Os resultados apontaram para ausência de toxicidade do CME, visto que este diminuiu as taxas de apoptose induzida.

Figura 4 - Microscopia de elétrons de transmissão (TEM, *a*) e microscopia de elétrons por escaneamento (SEM, *b*) de células U937 apoptóticas induzidas à apoptose por exposição a um CME durante vinte e quatro horas. As setas indicam aumento da cromatina na forma condensada. Observar a suavidade da superfície em *b*.

### D-Morphology (TEM/SEM)



Fonte: adaptado de Tenuzzo *et al.* (2006).

Pesquisas posteriores mostraram que o CME de **moderada intensidade** não é causa do estresse oxidativo, mas pode alterar as concentrações de zinco (AMARA *et al.*, 2007). A ativação de linfócitos humanos foi diminuída quando expostos ao CME, e, mais uma vez, constataram-se mudanças relacionadas à membrana.

Com relação à exposição aguda ao CME, um extenso estudo em ratos foi reportado por Yu e Shang (2014). Foram descritos e discutidos experimentos sobre dinâmica cardiovascular, índices hematológicos, saúde do esqueleto, atividade nervosa, função e comportamento cognitivo, capacidade de resposta imune e outros processos biológicos. Majoritariamente, as evidências sugerem que a exposição ao CME **não produz** bioefeitos adversos substanciais; de fato, muitos bioefeitos positivos do CME foram observados, como estabilização da pressão arterial, melhora na neuralgia, redução da incidência de tumores, entre outros, o que torna o CME uma possível ferramenta complementar ou alternativa no tratamento de doenças.

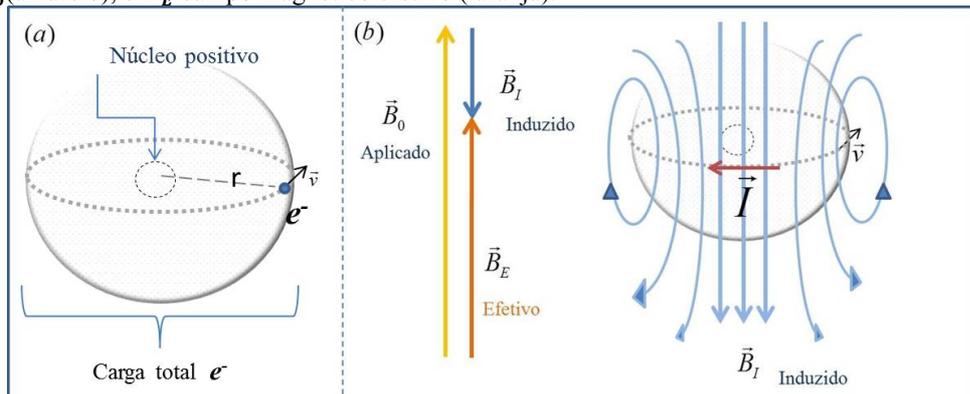
Um sistema mais complexo de análise foi proposto por Robert Usselman e seu grupo (USSELMAN *et al.*, 2016), no qual consideram a **Biologia Quântica** como uma assinatura de fenômenos em nível molecular observados em sistemas biológicos. Por exemplo, o controle da produção biológica de **Espécies Reativas de Oxigênio** (EROs) é realizado por meio da dinâmica de rotação coerente de *spins* eletrônicos em uma reação de par-radical (PR). As taxas de produção de ânions superóxido  $O_2^-$  e peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$ , produtos do EROs, são alterados pelos CME e CMV, que interferem na dinâmica dos *spins* eletrônicos, dando origem a estados de singleto ou tripleto.

### 1.3 DIAMAGNETISMO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

O átomo pode ser descrito pictoricamente como um sistema planetário cujo núcleo positivo denso é circundado por elétrons (Figura 5- (a)). Sabemos que, no Eletromagnetismo, as cargas elétricas em movimento ( as correntes elétricas) geram campos magnéticos. No átomo, neste caso, as correntes elétricas que geram campos magnéticos correspondem ao movimento dos elétrons em torno do núcleo (analogamente a “espiras de corrente”). Devido ao caráter aleatório do conjunto de todas as órbitas dos elétrons da eletrosfera, o campo magnético resultante em átomos com vários elétrons é ZERO. Portanto, se a matéria for exposta a um campo magnético estático (CME) externo (exógeno),  $B_0$ , as correntes elétricas endógenas (produzidas pelos elétrons atômicos) respondem a esse agente externo (ação e reação – Lei de Faraday do Eletromagnetismo) induzindo um campo magnético oposto a  $B_0$ ,  $B_1$  (conforme representado na Figura 5- (b)). Assim, a **intensidade de interação** da matéria com os CMEs dependerá de sua **constituição atômica**, sendo, portanto uma característica do material analisado, denominada “susceptibilidade magnética”. Os materiais constituídos por átomos que se opõem a um CME ( através de  $B_1$ ) são denominados de “diamagnéticos”. Essa “oposição” é muito pequena, de 6 a 10 ordens de grandeza menor relativamente aos campos dos materiais ferromagnéticos. A maioria dos compostos orgânicos e muitos inorgânicos são diamagnéticos.

Contudo, o diamagnetismo é importante para os sistemas biológicos não pela intensidade magnética induzida, e sim pelo fato de que o CME aplicado,  $B_0$ , distorce os orbitais eletrônicos dos componentes celulares, principalmente as estruturas atômicas não simétricas como os anéis aromáticos. Em decorrência, a dinâmica original do sistema é alterada, podendo levar à inibição de funções celulares vitais. Esse fenômeno físico é denominado *diamagnetismo anisotrópico* (FIGURA 5- (b)) (PURCELL, 1973).

Figura 5 - (a) descrição do modelo atômico planetário; (b) linhas de campo  $\vec{B}_I$  ( azul) induzidas pelo campo externo  $\vec{B}_0$  (amarelo), e  $\vec{B}_E$  campo magnético efetivo (laranja).



Fonte: adaptado de Purcell (1973).

A primeira interação de um CME de **intensidade moderada** ocorre com as membranas celulares (ROSEN, 2003), provocando reorientação de suas moléculas fosfolípídicas (DINI; ABBRO, 2005). Com isso, propriedades moleculares originais são afetadas, por exemplo, pela interferência na tensão de ativação dos canais de transporte iônico (LANGE, 2000). Esse efeito, decorrente da exposição de membranas excitáveis a CMEs de moderada intensidade, é um fenômeno geral e não limitado a um tipo específico de canal.

Ainda convém lembrar que a membrana celular não está relacionada apenas ao transporte seletivo entre as fronteiras celulares, mas é responsável, também, pela comunicação celular, coesão da colônia celular e apoptose (NELSON; COX, 2000). No interior da célula eucariótica, membranas ainda organizam a síntese de lipídeos e de certas proteínas, realizam a transdução de energia nas mitocôndrias e cloroplastos. Nas células procarióticas, a membrana plasmática também é o sítio onde ocorre a respiração aeróbica.

#### 1.4 ASPECTOS DA RADIAÇÃO

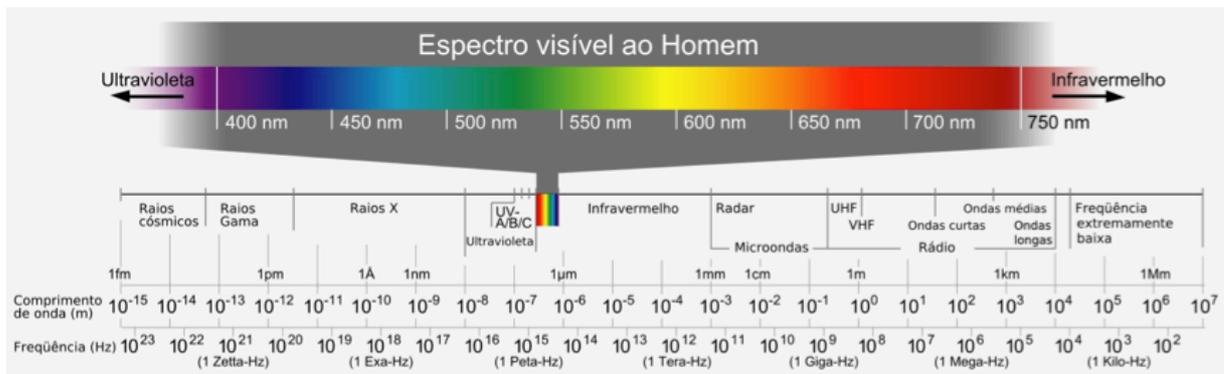
A radiação ionizante é uma das formas de transporte energia assim como a energia transportada pelas ondas sonoras produzidas por um altofalante. Neste último caso, a energia é transportada pela deformação do meio, isto é, o ar, e captada mediante indução de oscilações no tímpano. Analogamente, a radiação ionizante tem uma fonte emissora, transporta energia e interage de diferentes formas com a matéria alvo.

Os átomos instáveis, isto é, que não apresentam uma configuração eletrônica estável, desintegram-se em um estado energético menor e mais estável. Assim, a radiação origina-se de decaimentos nucleares. Há três categorias de decaimento nuclear: (1) o decaimento  $\alpha$ , que é a emissão espontânea de uma partícula energética ( $\alpha$ ) por um núcleo atômico pesado; (2) o decaimento  $\beta$ , em que existe a absorção ou a emissão espontânea de um elétron ou pósitron pelo núcleo; e (3) o decaimento  $\gamma$ , constituído pela emissão espontânea de fótons de alta energia pelo núcleo, por transição entre estados nucleares (EISBERG; RESNICK, 1979).

Os decaimentos  $\alpha$  e  $\beta$  são classificados como radiação ionizante corpuscular, por serem emissões espontâneas das partículas nucleares,  $\alpha$  (núcleo do átomo de hélio),  $\beta^-$  (elétrons) e  $\beta^+$  (pósitrons).

Na emissão de fótons energéticos, a radiação é denominada eletromagnética. As ondas eletromagnéticas *ad verbum* são luz (Figura 6). Uma onda eletromagnética é constituída por duas frentes de ondas, uma do campo elétrico e outra do campo magnético, ambos oscilantes e perpendiculares entre si. A velocidade de propagação no vácuo é dada por  $c = 3 \cdot 10^8$  m/s (OKUNO; YOSHIMURA, 2010). Raios-X e gamas são ondas eletromagnéticas de alta energia (Figura 6).

Figura 6-Espectro eletromagnético mostrando os comprimentos de onda (m) e frequência (Hz).



Fonte: <http://edxrf.if.usp.br/index.php/EDXRF/Teoria>

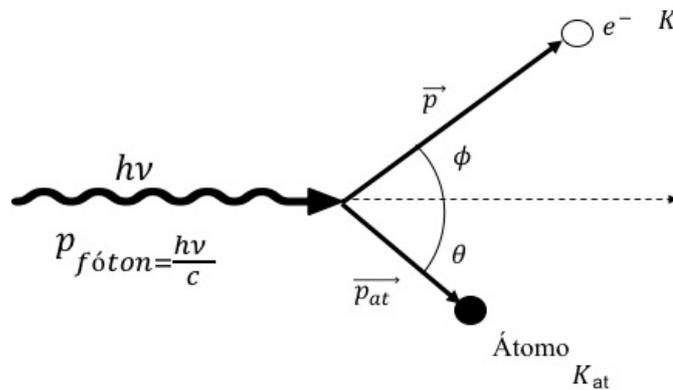
A radiação eletromagnética apresenta propriedades como a polarização, interferência e difração. A transferência de energia do fóton para o meio dar-se-á pela aquisição de energia cinética de partículas carregadas. As interações que ocorrem entre a radiação eletromagnética ionizante e a matéria são, principalmente: [1] efeito fotoelétrico, [2] efeito Compton (ou espalhamento inelástico), e [3] produção de pares elétron-pósitron (reações de “materialização”) (OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

No efeito fotoelétrico, o fóton incidente é completamente absorvido por um elétron do átomo alvo. Isso requer que os elétrons estejam ligados a átomos, pois um elétron completamente livre não pode absorver um fóton e conservar simultaneamente a energia e o momento relativístico totais (EISBERG; RESNICK, 1979). Essa energia absorvida é liberada por um dos elétrons de suas camadas exteriores (Figura 7). Quando um elétron é emitido da superfície de um metal, sua energia cinética é:

Equação 8 - Energia Cinética do elétron emitido

$$K = h\nu - w \quad (8)$$

Figura 7- Cinemática do efeito fotoelétrico, ilustrando os momentos das três partículas envolvidas: fóton, átomo (supõe-se que o íon formado é rapidamente neutralizado) e o elétron.

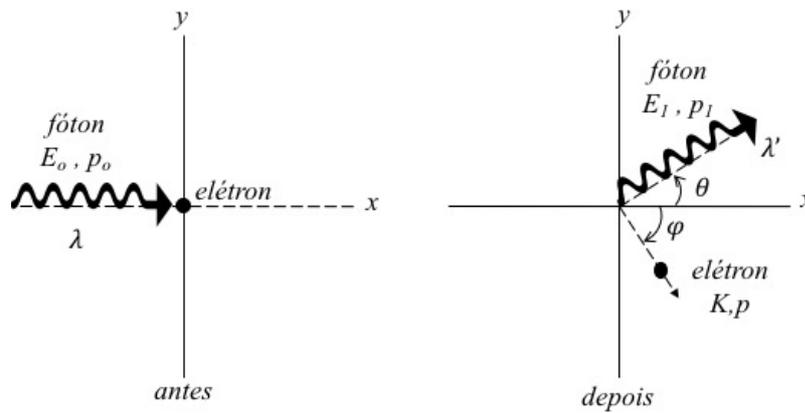


Fonte: adaptado de Eisberg e Resnick (1979).

Na equação 8 acima,  $h\nu$  é a energia do fóton liberado e  $w$  é o trabalho necessário para remover o elétron. Esse trabalho é necessário para superar os campos atrativos dos átomos na superfície e as perdas de energia cinética devidas às colisões internas do elétron. Em raios gamas de baixas energias, tal é o efeito de maior ocorrência.

O efeito Compton, ou interação incoerente, é a interação do fóton incidente que ocorre com elétrons fracamente ligados. O fóton é defletido de um ângulo  $\theta$  de sua direção original, transferindo parte da energia ao elétron de recuo (EISBERG; RESNICK, 1979). O ângulo de espalhamento pode ter qualquer valor (Figura 8), e a energia transferida ao elétron varia de zero a grandes frações da energia inicial do fóton incidente.

Figura 8 - A interação Compton. Um fóton de comprimento de onda  $\lambda$  incide em um elétron das últimas camadas. Após a colisão, o fóton é espalhado de um ângulo  $\theta$ , tendo seu comprimento de onda aumentado para  $\lambda' = h\nu'$ , enquanto o elétron se afasta segundo um ângulo  $\phi$ .



Fonte: adaptado de Eisberg e Resnick (1979).

A relação entre o ângulo do espalhamento  $\theta$  e a energia final do fóton é obtida a partir das leis de conservação da energia e o momento, sendo dada por:

Equação 9 - Energia final do fóton espalhado.

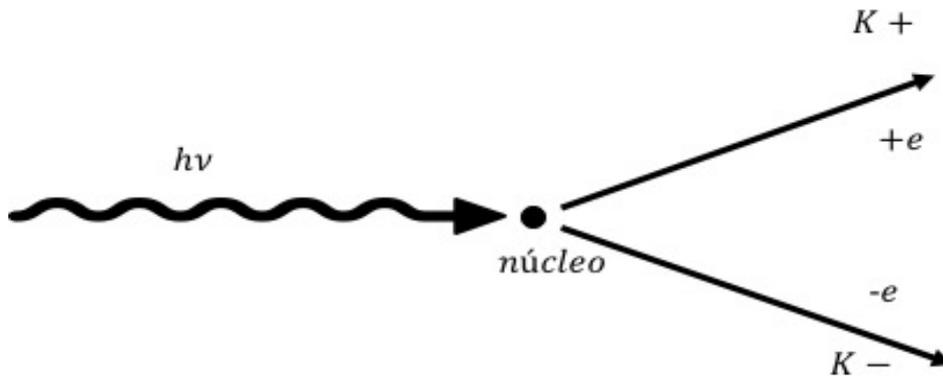
$$hv' = \frac{hv}{1 + \frac{hv}{m_0c^2}(1 - \cos\theta)} \quad (9)$$

em que  $hv$  é a energia do fóton incidente e  $hv'$  a energia do fóton espalhado. O termo  $m_0c^2$  corresponde à energia associada à massa de repouso do elétron (0,511 Mev).

A probabilidade de ocorrência do espalhamento Compton por átomo depende do número de elétrons disponíveis como alvos de espalhamento e, portanto, com o aumento do número atômico  $Z$ .

Além dos efeitos fotoelétrico e Compton, outro processo em que os fótons perdem sua energia na interação com a matéria é o processo de produção de pares. Nesse processo, ilustrado esquematicamente na Figura 9, um fóton de alta energia perde toda sua energia  $hv$  em uma colisão com um núcleo pesado, criando um par elétron-pósitron (EISBERG; RESNICK, 1979), em que  $K$  e  $K_+$  (Figura 10) são energias cinéticas do elétron e pósitron, respectivamente.

Figura 9 - O processo de produção de pares (materialização).



Fonte: adaptado de Eisberg e Resnick (1979).

O poder de ação da radiação depende da taxa da densidade de energia proveniente das ionizações ( $dE_{\Delta}$ ), por unidade de deslocamento linear em seu meio incidente ( $dl$ ). Essa grandeza física é denominada *Linear Energy Transfer* (LET):

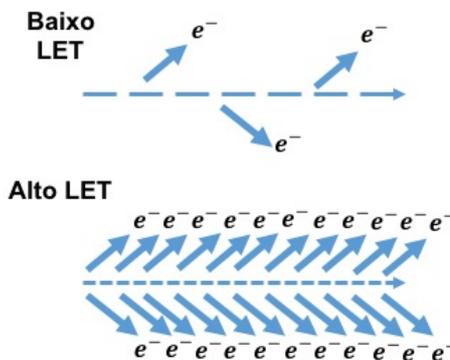
Equação 10 - *Linear Energy Transfer* (LET)

$$L = \frac{dE}{dl} \quad (10)$$

Figura 10 - Linear Energy Transfer (LET).

**Linear Energy Transfer (LET):** Taxa de energia depositada pela radiação pelo espaço percorrido.

$$LET = \frac{dE}{dl}$$



Fonte: adaptado de Okuno e Yoshimura (2010).

A radiação corpuscular, diretamente ionizante, tem maior probabilidade de interagir com a matéria, decorrente da interação coulombiana dessas partículas carregadas com as cargas distribuídas no meio incidente (Figura 10). Assim, apresentam um baixo poder de penetração e alto LET, criando muitas ionizações em sua propagação pela matéria.

A radiação eletromagnética é indiretamente ionizante, e, por essa razão, a matéria é “transparente” a ela, resultando em alta penetrabilidade no meio incidente, isto é, no baixo LET.

Os efeitos biológicos produzidos pela radiação são dependentes do LET da radiação. A Tabela 2 mostra alguns exemplos de valores considerados para o LET.

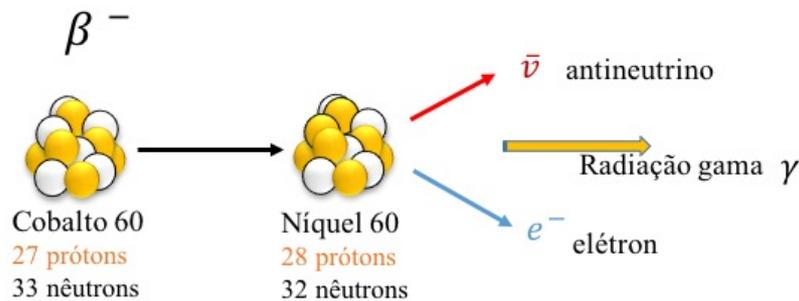
Tabela 2- Valores do LET em alguns tipos de radiação e energia, em água.

Partícula	Energia (MEV)	LET ( $keV.\mu m^{-1}$ )
raios gama do $CO^{60}$	1,25	0,2
raios X de 250kV	até 250 keV	2,0
prótons	10	4,7
prótons	150	0,5
alfa	2,5	166

Fonte: adaptado de Okuno e Yoshimura (2010).

A radiação eletromagnética gama, utilizada neste estudo, é emitida por núcleos residuais de Cobalto 60 resultantes de decaimentos beta (Figura 12), transformando-os em núcleos estáveis de Níquel.

Figura 11- Esquema ilustrativo do decaimento beta do Cobalto 60.

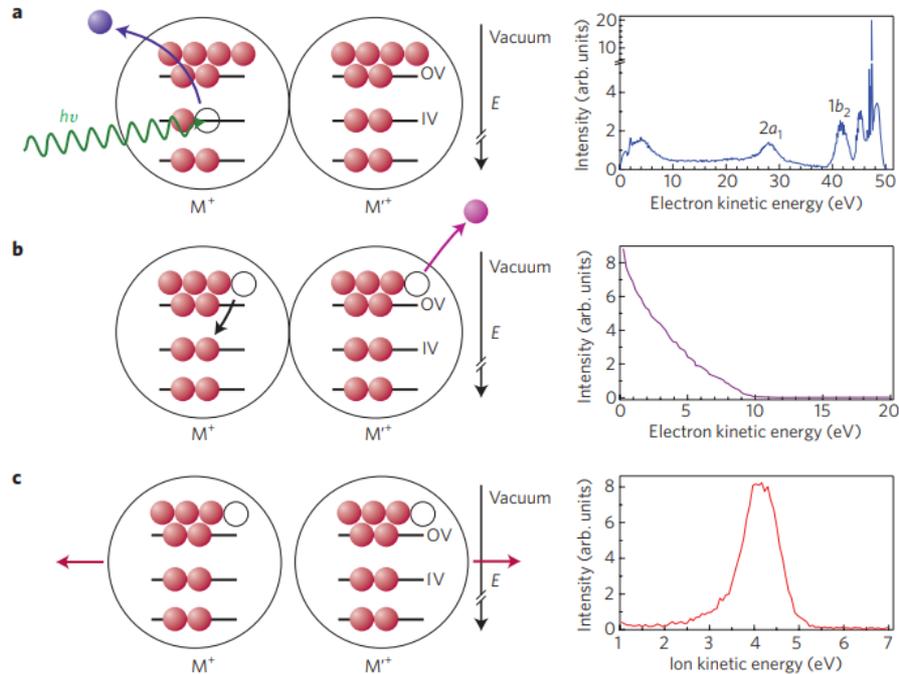


Fonte: elaborado pela Autora.

Os elétrons secundários, criados na interação dos raios gamas com a matéria, ionizam muito mais átomos do que o fóton primário. O efeito deletério dos elétrons secundários é significativo, mesmo apresentando energias abaixo de  $20 eV$ , pois são abundantes na trajetória da radiação na matéria. Assim, os elétrons secundários são capazes de causar danos significativos no DNA (MÄRK; SCHEIER, 2010). Uma grande fração desses elétrons é gerada por um processo de autoionização relativamente incomum conhecido como decaimento coulombiano interatômico ou intermolecular (DCI) (Figura 12). Logo, a avaliação dos danos produzidos pelas radiações tem como base tanto o LET quanto a natureza da radiação e o meio.

Figura 12 - Ilustração das três etapas do DCI: (a) na primeira etapa desse processo, um fóton incidente de alta energia (seta verde) ioniza uma das moléculas M de um dímero de água (ou aglomerados), gerando uma vaga de valência interna (IV) na molécula M\* e um fotoelétron (esfera azul). O espectro de energia típico para elétrons emitidos por fótons incidentes de  $60 eV$  é mostrado à direita. (b), a autoionização intermolecular ocorre quando

um elétron da camada externa OV cai nessa vaga e subsequentemente excita a ejeção de um elétron da camada externa (esfera rosa) de uma molécula vizinha ( $M^+$ ), produzindo uma vaga de valência externa (OV) em  $M^+$ . Isso resulta em uma distribuição ampla e de baixa energia de elétrons secundários, como mostrado à direita. (c), as duas moléculas no dímero (ou *cluster*) subsequentemente se separam por um processo de repulsão coulombiana em dois íons  $H_2O^+$ . À direita, é mostrada a distribuição de energia cinética dos íons.



Fonte: adaptado de Märk e Scheier (2010).

A ionização causa desequilíbrio eletrostático no meio porque o elétron livre vai interagir com a matéria, estabelecendo assim uma cascata de eventos moleculares. A molécula de DNA pode sofrer ação direta, sendo ionizada pela transferência de energia da radiação, ou indiretamente, resultante das interações com os radicais livres que se formaram devido à ionização do meio. Por exemplo, o estresse oxidativo é consequência de níveis tóxicos de espécies reativas derivadas de oxigênio (ERO), sendo as principais: superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e o radical hidroxila ( $HO\cdot$ ).

Assim, as interações das radiações com a matéria são um constructo de processos energéticos que ionizam direta ou indiretamente as moléculas, e, também, dependente do meio alvo.

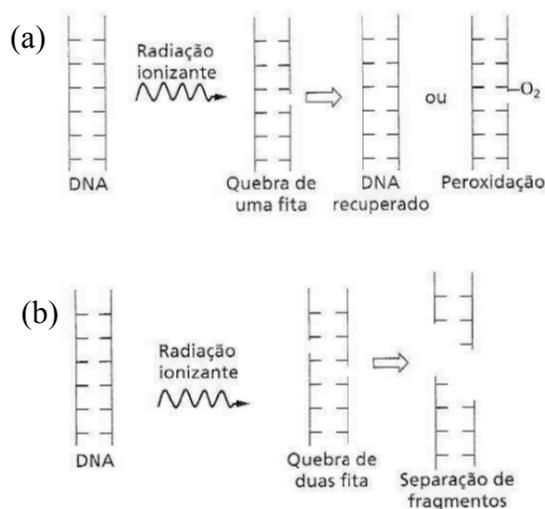
## 1.5 DANOS RADIOBIOLÓGICOS

Sendo o DNA a maior molécula da célula, possui a maior seção de choque geométrica para interação com as radiações ionizantes. Contudo, foi demonstrado mais recentemente que

a oxidação proteica é a principal causa de morte celular induzida por radiações ionizantes (SLADE; RADMAN, 2011).

Cerca de 30% da quebra das fitas são causados pela ação direta da radiação ionizante, em que essa radiação incide diretamente na molécula do DNA. Os danos restantes são causados de forma indireta, isto é, o DNA sofrerá ação de hidroxilas (radicais livres OH<sup>•</sup>) e elétrons secundários (Figura 13) (ARRUDA-NETO *et al.*, 2013). Os radicais livres e os elétrons secundários são produzidos na trajetória da radiação ionizante na matéria (OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

Figura 13 - Ilustrações das quebras simples e duplas das fitas do DNA. (a) peroxidação na molécula do DNA danificado que não se recupera adequadamente. (b) quebra das duas fitas do DNA pela radiação ionizante.



Fonte: adaptado de Okuno e Yoshimura (2010).

Assim, as moléculas de DNA resultam em quebras simples (QSF), em que uma das fitas é danificada, ou quebras duplas de fitas (QDF), em que as duas fitas são rompidas. As energias médias de rompimento são 50 eV e 200 eV, respectivamente. Por sua dificuldade de reparo, as QDF podem, geralmente, resultar na morte direta ou em mutações que levem à apoptose.

Os efeitos das radiações são resultantes de estágios de ação, dependendo da complexidade do sistema alvo. Esses estágios são: (1) *físico*, em que ocorrem ionizações e excitações dos átomos que constituem as moléculas; (2) *físico-químico*, quebra das ligações químicas das moléculas em consequência da ionização de um de seus átomos; (3) *químico*, quando os fragmentos das moléculas se ligam a outras, como proteínas e enzimas; e (4) *biológico*, em que os danos produzem alterações morfológicas e/ou funcionais nos órgãos.

Em nosso experimento, os efeitos da radiação gama referem-se aos três primeiros estágios e alcançando o nível celular. Para efeito de comparação entre a radiorresistência da bactéria *D. Radiodurans* e humanos, a Tabela 3 apresenta alguns valores de dose e efeitos.

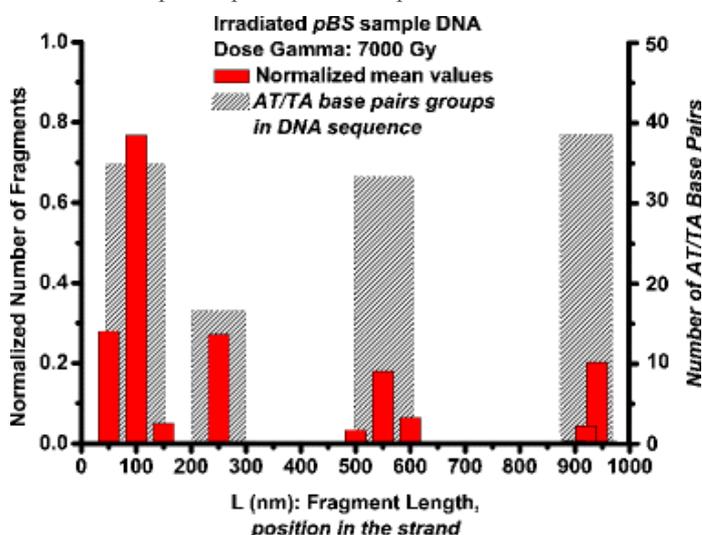
Tabela 3- Intervalo de dose associada com a morte nos seres humanos e na bactéria *D. radiodurans*, expostos uniformemente a uma dose aguda de radiação de baixo LET.

DOSE (Gy)	DANOS	TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA
5-15	Humanos: nos pulmões e rins	60-150 dias
15-20	Humanos: no sistema nervoso central	< 5 dias
12 000-13 000	<i>D.radiodurans</i> :letal	morte instantânea

Fonte: adaptado de Okuno e Yoshimura (2010).

Como demonstrado em experimentos realizados em nosso Laboratório (GONZÁLEZ, 2012), com plasmídeos irradiados com elétrons e gamas, ocorre quebra preferencial no par de bases adenina com timina (AT) das bases componentes do DNA.

Figura 14 - Resultados dos tamanhos normalizados dos fragmentos dos plasmídeos obtidos com 7kGy, em vermelho. A quebra preferencial é apontada nas áreas hachuradas (AT).



Fonte: González *et al.* (2012)

A partir dos efeitos acima apresentados, observa-se que os danos radiológicos em sistemas biológicos dependem da complexidade dos efeitos e dos estágios da radiação. Slade e Radman (2011), em resumo, asseveram que a capacidade de sobrevivência celular está relacionada a outros fatores além dos danos ao DNA, como: [1] sistema de reparo, [2] capacidade em reparar danos em todas as macromoléculas celulares (ex.: proteínas), e [3] prevenção e processamento do estresse oxidativo resultante de EROs.

## 1.6 MODELOS BIOLÓGICOS – BACTÉRIAS EXTREMÓFILAS

Linhagens cancerígenas de células eucarióticas (carcinomas, sarcomas, leucemias e linfomas) têm sido muito utilizadas como modelos biológicos em estudos oncológicos (IMAMURA *et al.*, 2002).

Os estudos *in vivo*, além das dificuldades e complexidades experimentais, enfrentam crescente resistência por parte da opinião pública e avaliações mais rigorosas por parte dos Comitês de Ética. Já a manipulação em laboratório de material *in vitro*, notadamente de células humanas, resulta em descaracterização de algumas propriedades como sensibilidade e taxa de crescimento. De fato, foi constatado que, em tratamentos *in vitro*, células de tumores malignos são mais sensíveis à radiação do que no corpo humano, devido à presença de oxigênio e à falta de irrigação sanguínea.

As pesquisas em diagnóstico e tratamento se diversificaram e intensificaram nos últimos anos. No tratamento contra o câncer, as associações terapêuticas apresentam os melhores índices de remissão. No tratamento conjunto com a radiação ionizante, o objetivo é causar o maior número de danos letais nas células cancerígenas.

Na interação da radiação ionizante com as células, não ocorrem danos oxidativos somente no DNA, mas também em todas as macromoléculas celulares por meio da produção de EROs. Essa toxicidade pela radiação danifica as proteínas resultando na morte celular, como descrito na literatura por Slade e Radman (2011).

Organismos que respondam de forma similar, como algumas espécies de bactérias, são **simuladores de algumas particularidades de células humanas**. Nesse sentido, em trabalhos pioneiros de Imamura e colaboradores (IMAMURA *et al.*, 2002), utilizaram-se células da bactéria *Deinococcus radiodurans* para simular o efeito do EROs em células cancerígenas. Ao contrário de células humanas (*in vitro*), possuem crescimento rápido, são de fácil manipulação e muito resistentes à radiação e ao calor.

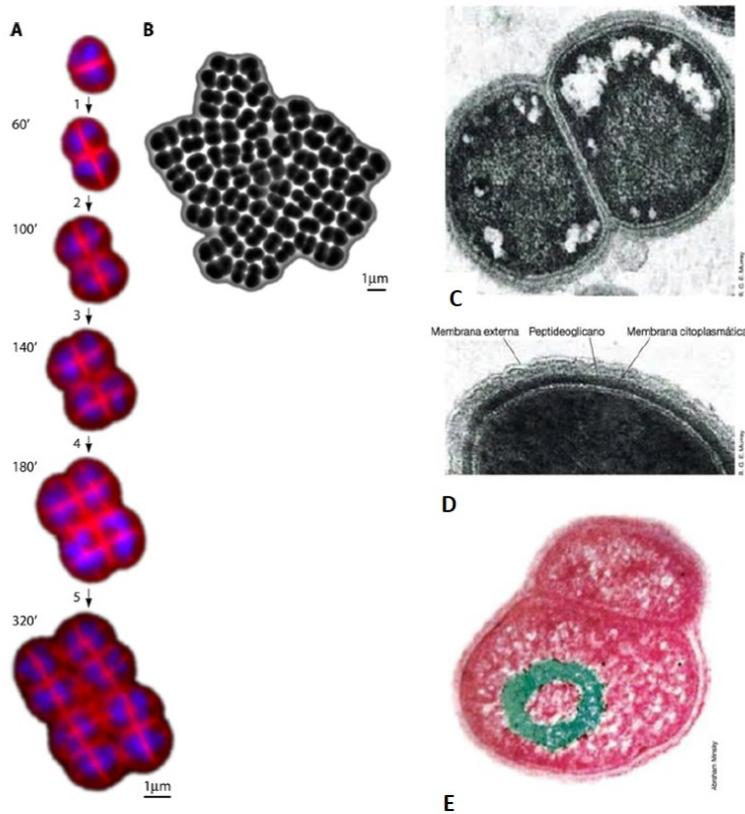
### 1.4.1 A bactéria *Deinococcus radiodurans*

De fato, a bactéria extremófila *Deinococcus radiodurans* tem sido um modelo biológico muito frequente na agenda de Biólogos Moleculares e Celulares e em estudos de Exobiologia, principalmente devido a seus intrigantes e complexos mecanismos de proteção, proteoma e reparo de DNA, após exposição a altas doses de radiação ionizante [1-3].

Sua radiorresistência levou a muitos trabalhos acadêmicos, e atualmente está amplamente descrita na literatura. Essa bactéria foi identificada pela primeira vez em carne enlatada após um tratamento de esterilização na década de sessenta (ANDERSON *et al.*, 1956). Sua incrível capacidade de superar o estresse oxidativo, mais eficientemente do que qualquer outro organismo conhecido, fomentou pesquisas relacionadas ao câncer, reparo celular e, até mesmo, a teorias de panspermia.

*D. radiodurans* é gram positiva, possui uma parede celular com uma estrutura complexa de multicamadas (Figura 15-(d)), herança de espécies gram-negativas. Apresenta facilidade em lidar com mudanças de seu volume celular devido à plasticidade de sua membrana. As células da *D. radiodurans* estão agrupadas em duplas ou em tétrades (Figura 15 -(a)(b)); seu DNA não é disperso no citoplasma mas, ao invés, se mantém na forma toroidal (Figura 15- (d)), o que facilita a recombinação homóloga após danos ao DNA.

Figura 15 - *Deinococcus radiodurans*. (a) monitoramento da divisão celular por microscopia de fluorescência; (b) uma colônia formada por uma única tétrade; (c) microscopia eletrônica de transmissão membrana destaque aos grânulos de carboidratos e polifosfatos; (d) membrana e parede externa; (e) morfologia toroidal do nucleóide (verde).

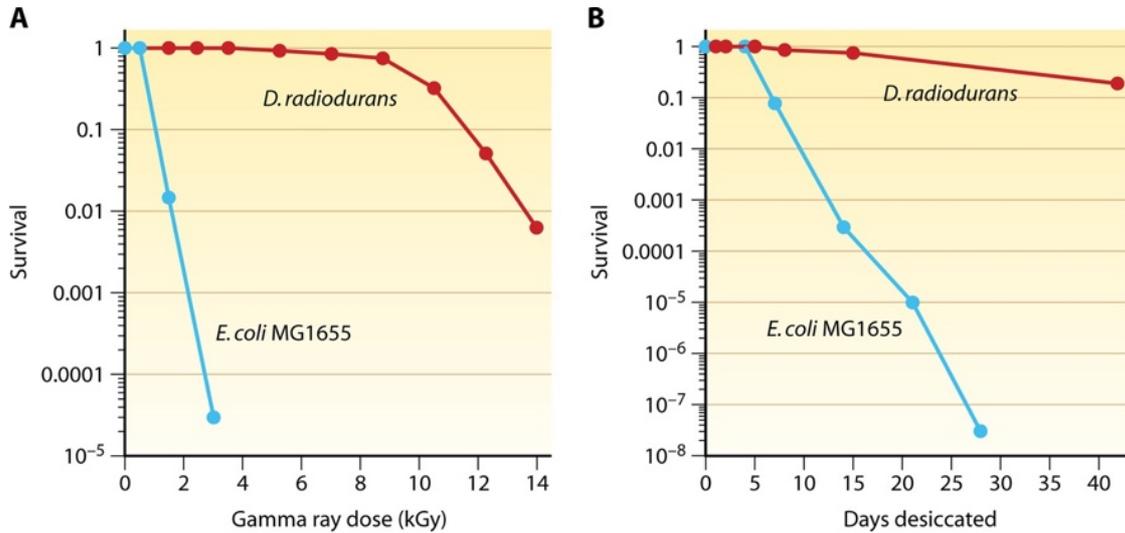


Fonte: adaptado de Mardigan *et al.* (2016).

Sistemas de **reparo por excisão de nucleotídeos (NER)**, extremamente eficientes, permitem o reparo de danos nas bases e nucleotídeos com uma ampla gama de especificidades de substrato. As quebras na fita dupla (QFD) do DNA são a forma mais grave de dano ao DNA, e são corrigidas por uma ação sequencial de dois mecanismos: por junção de extremidades nãohomólogas; e recombinação homóloga (ALBERTS; BRAY; LEWIS, 2009).

*D. radiodurans* é 30 e 1.000 vezes mais resistente à radiação ionizante do que *E. coli* e humanos, respectivamente, e pode reparar aproximadamente 200 QFDs sem perda de sua viabilidade (SLADE; RADMAN, 2011). A extrema sobrevivência da *D. radiodurans* exhibe curvas sigmoidais contra a radiação ionizante, que são caracterizadas por ombros largos seguidos por declives exponenciais. O mecanismo de reparo da *D. radiodurans* é eficiente em doses muito elevadas, de até  $8kGy$ , enquanto a *E. coli* é inativada em  $2,5 kGy$ . (Figura 16-(a)). Sua capacidade de sobrevivência na ausência de água é notável dado que pode sobreviver a mais de 40 dias em dessecação.

Figura 16 - curvas de sobrevivência da bactéria *D. radiodurans* (a) aos raios gamas; (b) à dessecação.



Fonte: adaptado de Slade e Radman (2011).

Contudo, pesquisas demonstraram que a bactéria *D. radiodurans* tem a mesma probabilidade de danos de duplas quebras de fitas das outras bactérias (SLADE; RADMAN, 2011). Todavia, seu proteoma é muito eficiente em lidar com os danos e as EROs. Essa constatação sugere que tanto o dano direto ao DNA, quanto o dano às proteínas e ao mecanismo de reparo, determinam sua capacidade de sobrevivência.

Assim, segundo Slade e Radman (2011), a radioresistência é um conjunto de ações tais quais: limpeza celular, defesas antioxidantes e reparo do DNA. Na limpeza celular, estão presentes a degradação de nucleotídeos oxidados por enzimas Nudix hidrolases, a exportação de oligonucleotídeos danificados e a degradação proteolítica (digestão) das proteínas oxidadas. Nas defesas antioxidantes o sistema é composto por catalisadores não enzimáticos, como os complexos de manganês, carotenoides e captadores enzimáticos, e como enzimas que catalisam a dismutação do superóxido. Sobre os mecanismos de reparo e maquinaria do DNA: [1] *base excision*: atua nos danos a bases de DNA e nucleotídeos; [2] reparo *excision repair*: remove os nucleotídeos danificados; [3] reparo de dupla quebra, que reestrutura as cadeias de nucleotídeos dependentes de síntese; e [4] recombinação homóloga, que corrige rupturas de dupla quebra na cadeia de DNA.

Em trabalhos realizados pelo Grupo, utilizou-se a bactéria *D. radiodurans* para a simulação de tratamentos radioterápicos. A bactéria apresentou uma diminuição no ombro de

reparo de 8 para 4kGy com a ação de CEE logo após a irradiação. (ARRUDA-NETO *et al.*, 2014).

Para altas doses de radiação gama, como as utilizadas neste trabalho, o DNA celular é fragmentado num grande número de pequenos fragmentos. Doses de 7 e 14 kGy de radiação ionizante resultam em QDF de tamanhos entre 30 a 40kb e 10 a 20kb, respectivamente (SLADE; RADMAN, 2011). Desse modo, para altas doses de radiação, a cinemática celular estará comprometida dado que o mecanismo de reparo também é deteriorado.

A partir dos resultados acima descritos a bactéria *Deinococcus radiodurans* foi selecionada para este estudo, em que se procurou obter melhor caracterização fenomenológica da ação do CME de moderada intensidade na sobrevivência celular, após a exposição a altas doses de radiação ionizante eletromagnética (gamas).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos *biofísicos não específicos* induzidos por Campos Magnéticos Estáticos: (1) efeitos associados à viabilidade celular; (2) interferência em mecanismos de reparo; (3) proposta e desenvolvimento de modelos biofísicos que interpretem os resultados obtidos. Espécies bacterianas foram utilizadas como modelos biológicos (detalhes em Materiais e Métodos).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1- Estudar a ação de Campos Magnéticos (citotóxica ou estimuladora do crescimento) em bactérias expostas à radiação gama.
- 2- Projeto e construção de um artefato motorizado, **original**, para a geração de Campos Magnéticos Variáveis (CMV) a partir de Campos Magnéticos Estáticos (CME).
- 3- Obter curvas de crescimento/sobrevivência de células dos modelos biológicos (especificados em Materiais e Métodos) expostas a CME em função do tempo de exposição e intensidade dos campos.
- 3- Identificar formal e experimentalmente as peculiaridades dos efeitos biológicos obtidos após a exposição a campos magnéticos genuínos.
- 5- Desenvolver um modelo teórico/fenomenológico para os efeitos *biofísicos não específicos*, a partir de hipóteses estatísticas com a identificação da estocasticidade dos processos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MICRORGANISMOS

Na realização deste experimento, foram utilizadas culturas das seguintes bactérias: *Deinococcus radiodurans*, originalmente cedida em 2011 pelo Dr. Carlos Eduardo Bonacossa de Almeida do Instituto de Radioproteção e Dosimetria do Rio de Janeiro/IRD-RJ, hoje criopreservada nos laboratórios da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luiziana Ferreira da Silva e do Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez. A linhagem da bactéria *Escherichia coli* ATCC11229, cedida por esses professores, foi selecionada como controle negativo.

#### 3.2 MEIOS DE CULTURA

Neste projeto, foram utilizados os seguintes meios de cultura: TGY (Tabela 4); Tripticase Glucose Levedura (Anderson *et al.*,1956) para *D.radiodurans*, LB (Tabela 5); (MILLER, 1992) para *E. coli*.

Tabela 4- Composição do meio TGY

Meio TGY	
Bacto Triptona	10,0g
Extrato de Levedura	6,0g
Glicose (solução 100g/L)	20ml
Água destilada q.s.p.	1000ml
Agar (para meios sólidos)	20,0g

Fonte: adaptado de Anderson *et al.* (1956).

Tabela 5- Composição do meio LB

Meio LB	
Bacto Triptona	10,0g
Extrato de Levedura	5,0g
NaCl	5,0g
Água destilada q.s.p.	1000ml
Agar (para meios sólidos)	20,0g

Fonte: adaptado de Miller (1992).

#### 3.3 ESTERILIZAÇÃO

Todos os materiais utilizados e meios de cultivo foram esterilizados em autoclave a 121<sup>o</sup>C por 15 minutos.

### 3.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As condições de cultivo de cada uma das linhagens bacterianas estão apresentadas na Tabela 6. As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica ou agitador rotativo.

Tabela 6 - Condições de Cultivo de linhagens bacterianas

<b>Linhagem bacteriana</b>	<b>Meio de Cultura</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Agitação (rpm)</b>
<i>D.radiodurans</i>	TGY	30	200
<i>E. coli</i>	LB	37	150

Fonte: elaborado pela autora.

### 3.5 PRESERVAÇÃO DE BACTÉRIAS

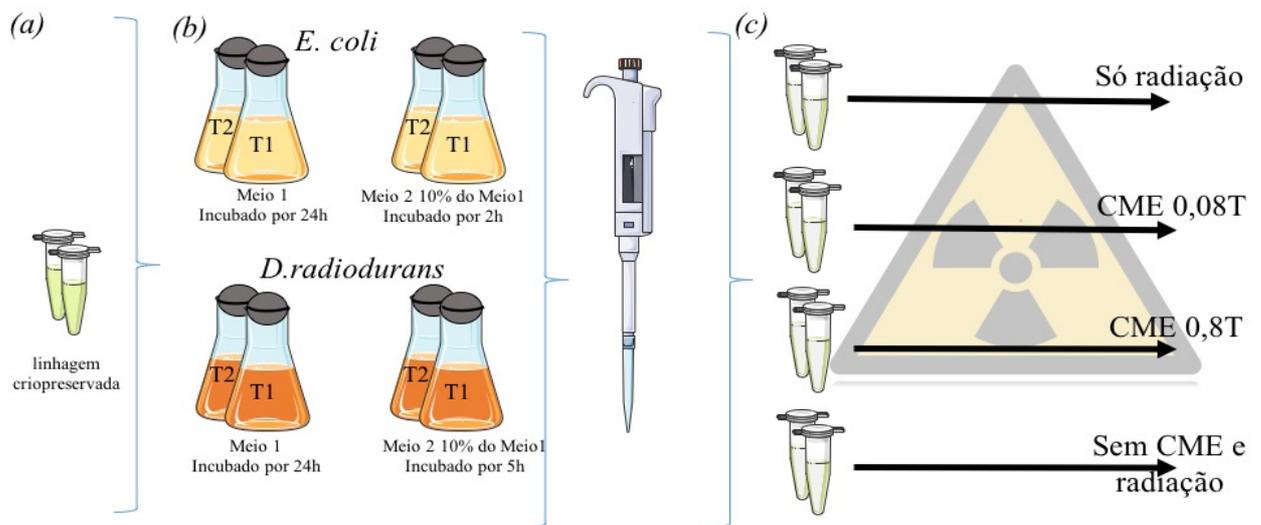
Na execução dos experimentos, as linhagens bacterianas *D. radiodurans* e *E. coli* estavam suspensas em solução de glicerol e criopreservadas em *freezer*, na temperatura de -80°C. Cada linhagem bacteriana foi incubada em seu respectivo meio de cultivo líquido segundo as características de cultivo (Tabela 6), utilizando-se uma estufa bacteriológica até atingir a fase estacionária (Slade e Radman, 2011), como inoculador de um novo meio de cultura. Esse novo meio de cultivo (Meio 2) foi, depois, diluído 1:1 em solução de glicerol a 20% (*m/v*), produzindo, assim, o estoque. A suspensão de células em glicerol foi mantida em congelador a -15°C por 1 hora, sendo então novamente preservada a temperatura de -80°C.

### 3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS:

As amostras foram retiradas de cada cultivo bacteriano segundo suas características de crescimento, e todos os testes foram acompanhados de amostras de controle.

A partir dos inóculos criopreservados de *D. radiodurans* [Figura 17 (a)] foram criados dois meios de cultivo iniciais incubados por 24h (Meio 1- T1 e Meio 1- T2) [Figura 17(b)].

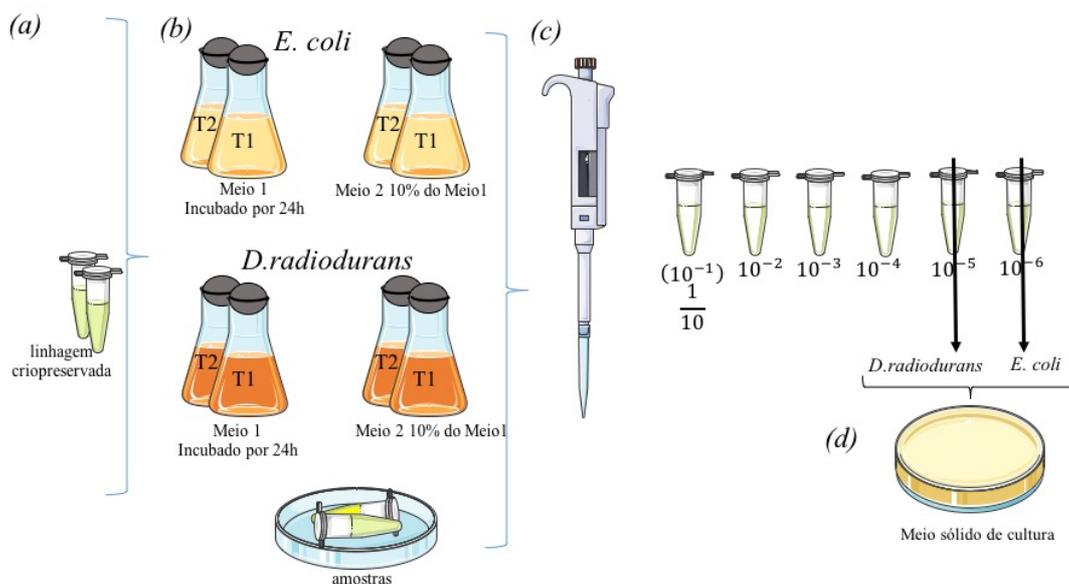
Figura 17 - Esquema ilustrativo da preparação das amostras líquidas.



Fonte: elaborado pela autora.

Para realizar a exposição aos agentes físicos exógenos, radiação gama e campo magnético estático, as amostras do grupo de teste e de controle foram retiradas dos meios de cultivo em fase exponencial (Meio 2), e para cada Grupo T1 e T2. (Figura 17 (b)). Testes exploratórios indicaram que as diluições necessárias para a quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC) eram, respectivamente,  $1/100000$  ( $10^5$ ) para a bactéria *D. radiodurans* e  $1/1000000$  ( $10^6$ ) para a *E. coli* (Figura 18 ). Essa diluição foi empregada na caracterização das curvas de crescimento e nos experimentos de sobrevivência, descritos adiante no texto.

Figura 18 - Esquema ilustrativo da diluição seriada.



Fonte: elaborado pela Autora.

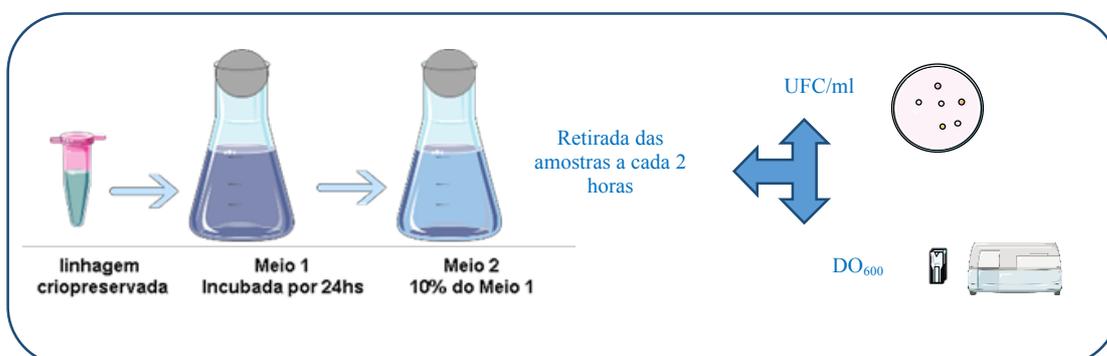
Nos experimentos de sobrevivência, foram retiradas quatro amostras com  $1\text{mL}$  cada, e acondicionadas em tubos de microcentrífugas de  $1,5\text{mL}$  (Figura 17 (b) ). Isto é, para cada um dos testes em diferentes doses da radiação gama, foram utilizadas oito amostras por bactéria, quatro por Grupo T1 e T2 (Figura 17 (c)).

Posteriormente à exposição aos agentes exógenos, as amostras foram diluídas como descrito acima, cultivadas em meios sólidos (Figura 18 (d)) e acondicionadas nas estufas bacteriológicas por 24h para *E.coli* e 48h para *D.radiodurans* até a quantificação da viabilidade celular.

### 3.7 CURVAS DE CRESCIMENTO

A tomada de dados para o estabelecimento das curvas de crescimento das bactérias *D.radiodurans* e *E. coli* partiu dos inóculos das linhagens criopreservadas em seus respectivos meios de cultura (TGY e LB), e incubadas por 24 horas em estufa bacteriológica com agitador rotativo. Essas culturas foram empregadas na inoculação do novo meio de cultura (Meio2) que corresponde a 10% do volume anterior (TGY e LB). As curvas de crescimento foram aferidas por meio de determinações da **viabilidade celular**, resultante da contagem direta das colônias crescidas em meio sólido (UFC/mL) e por medidas da absorbância das culturas a  $600\text{nm}$  ( $\text{DO}_{600}$ ) em espectrofotômetro, a cada 2 horas para cada bactéria. (Figura 19) [UFC = unidades formadoras de colônias].

Figura 19 - Esquema ilustrativo da metodologia para a determinação da curva de crescimento, das bactérias *D.radiodurans* e *E. coli*.



Fonte: elaborado pela Autora.

### 3.8 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular das bactérias foi determinada após diluições decimais seriadas em solução salina (NaCl 0,85%), seguidas de inoculação de 6 gotas de 25 $\mu$ L cada uma, na cultura crescida nas placas de Petri contendo o meio de cultura sólido correspondente a cada bactéria. As placas resultantes foram incubadas na estufa bacteriológica segundo suas características de cultivo (Tabela 6).

A incubação em estufa bacteriológica difere em temperatura e tempo de inoculação; estes são, respectivamente, *E.coli* 24h a 37°C, e *D.radiodurans* 48h a 30°C. O número de colônias será determinado pela contagem de colônias por unidade de volume de solução. Assim, a determinação da viabilidade celular será calculada pela relação:

Equação 11 - Viabilidade Celular.

$$\text{Viabilidade Celular} = \text{Número Médio de Colônias} \times 10^n [\text{UFC}] \quad (11)$$

Os resultados foram apresentados como curvas de viabilidade em função do tempo, para diferentes intensidades e tipos de CME.

O conjunto dos dados foi interpretado com base na divisão da amostra de teste pela amostra de controle, pois as amostras são preparadas a partir de meios de cultivos diferentes.

### 3.9 EXPOSIÇÃO A CAMPOS MAGNÉTICOS

Para a realização deste experimento, duas formas de exposição ao CME foram adotadas: [1] em equipamento proposto neste projeto (descrito abaixo), que entrega 0,08T em média, situado no limite inferior do CME de intensidade moderada; e [2] com Eletroímã Walker Scientific, localizado no laboratório de Magneto-Óptica e Espectroscopia NãoLinear do Instituto de Física da USP, coordenado pelo Prof. Dr. Antonio Martins Figueiredo Neto. Esse equipamento produz um campo magnético, estático ou variável, com intensidades de 0,1 a 0,8 T. Nos testes, foi utilizada a intensidade de 0,8T de CME, alcançando assim o limite superior em CME de moderada intensidade.

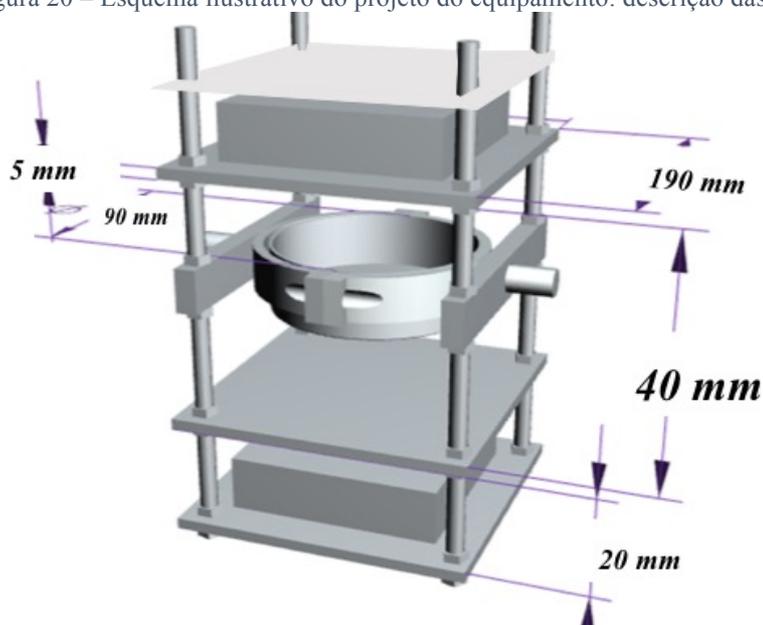
#### 3.9.1 *Design* experimental para o dispositivo de exposição ao Campo Magnético Estático

Um **equipamento original** foi projetado para a obtenção de Campos Magnéticos Estáticos (CME) e para futuros trabalhos em Campos Magnéticos Variáveis (CMV), conforme esboçado na Figura 20. Esse equipamento é composto por três placas de cobre

paralelas e uma de alumínio, com 190x190x5mm cada uma. Nas extremidades de cada placa, quatro parafusos são utilizados para separar e sustentar essas placas horizontalmente. Nas placas superior (1) e inferior (3), ficam apoiados conjuntos de ímãs de neodímio ( $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$ ) 20x40x10mm. Cada conjunto é formado por 48 ímãs. Entre as placas internas da estrutura (1 e 2,) é alocada a placa de Petri apoiada nas extremidades do eixo.

O fluxo das linhas de campo no interior da estrutura é uniforme e contínuo longe das extremidades (Figura 20). As amostras com 1mL cada uma, em meio líquido armazenado em tubos de microcentrífugas, foram expostas ao campo magnético produzido pelos conjuntos de ímãs.

Figura 20 – Esquema ilustrativo do projeto do equipamento: descrição das dimensões do equipamento.



Fonte: elaborado pela Autora.

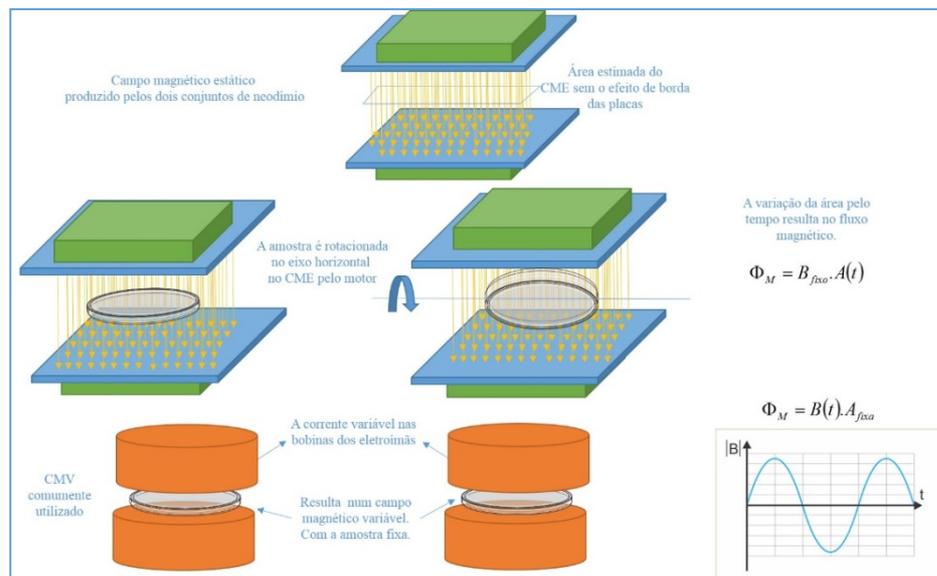
Desta forma, o aparato permitiu expor as culturas a campos magnéticos estáticos (e variáveis para utilizações futuras). O campo magnético do equipamento foi mapeado, e a área de exposição ao CME foi estimada excluindo-se o efeito de bordas nas extremidades das placas.

Para avaliar a sobrevivência celular sob a ação do CME, as amostras em meio de cultivo líquido após as irradiações foram expostas ao campo. Em seguida aos testes, as amostras foram diluídas e calculamos a viabilidade celular (VC) segundo a equação 8, resultando na porcentagem de células que sobreviveram ao tratamento.

O equipamento foi projetado para a exposição aos CME e CMV. Neste trabalho, fizemos testes para o CME; contudo, o CMV foi contemplado na elaboração. Para a produção de CMV, o motor gira a amostra, variando o fluxo magnético como descrito na metodologia.

O motor foi cedido pelo Centro de Engenharia em Assistência Cardíaca do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia –São Paulo. A calibração das rotações (rpm) produzidas pelo motor foi realizada em função da corrente entregue pela fonte de tensão de 127V. O motor, porém, não possui ainda uma boa ergonomia: por exemplo, as vibrações do eixo de suporte da amostra, e fixação da amostra no suporte. Dessa forma, não foram realizados os testes com CMV.

Figura 21- Esquema ilustrativo da obtenção do CME e CMV: no equipamento construído; e no comumente utilizado em pesquisas com CME e CMV.



Fonte: elaborado pela Autora.

### 3.9.2 Medição da intensidade dos Campos Magnéticos Estáticos.

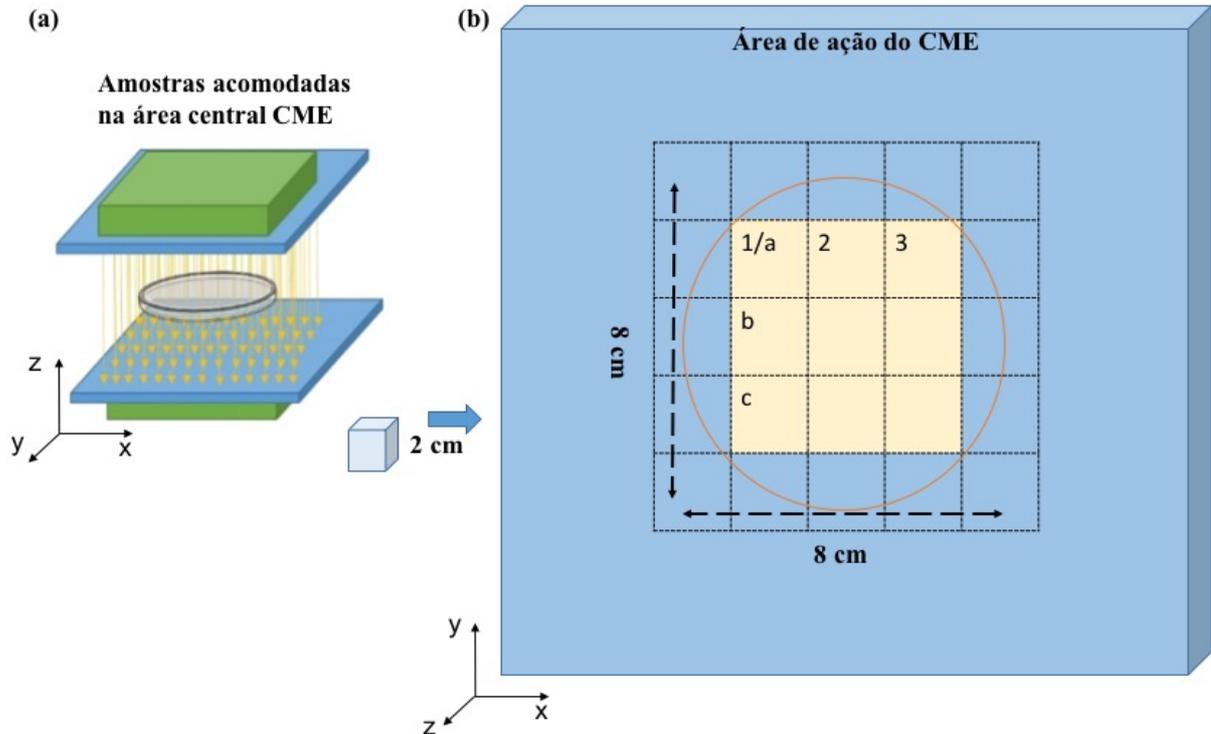
As amostras foram expostas a duas intensidades moderadas de CME, 0,8T entregue pelo eletroímã, e o campo no limite inferior de 0,08T entregue pelo equipamento projetado neste trabalho.

#### 3.9.2.1 Medição da intensidade do Campo Magnético Estático produzido pelo equipamento desenvolvido.

As medições da intensidade do campo magnético estático produzido pelo equipamento foram realizadas no Laboratório do Acelerador Linear no Instituto de Física da Universidade de São Paulo, por meio de um gaussímetro. Testes preliminares apontaram que a distância de quatro centímetros entre as placas do equipamento é a ideal para a obtenção de CME, no

limite inferior de moderada intensidade. As amostras líquidas em tubos de microcentrífugas fixadas na placa de Petri foram expostas ao CME na área central do equipamento.

Figura 22 - Esquema ilustrativo da exposição das amostras no CME do equipamento. (a) posicionamento das amostras na área central da ação do CME; (b) na calibração propomos a divisão da área de ação do CME em cubos de 2cm.



Fonte: elaborado pela Autora.

Nove pontos foram estudados (Figura 22) dentro da área central de ação do CME do equipamento. Na Tabela 7 apresentamos os pontos já convertidos em Tesla:

Tabela 7- Resultados das medições em 9 pontos diferentes na área central do equipamento, com a média dos valores (Tesla-T) e o desvio padrão

<b>posição</b>	<b>1a</b>	<b>2a</b>	<b>3a</b>
	0,093	0,089	0,087
	0,087	0,085	0,083
	0,082	0,081	0,082
desv.pad.	0,006	0,004	0,003
média	0,087	0,085	0,084

<b>posição</b>	<b>1b</b>	<b>2b</b>	<b>3b</b>
	0,087	0,084	0,088
	0,089	0,082	0,084
	0,086	0,086	0,083
desv.pad.	0,002	0,002	0,003

média	0,087	0,084	0,085
<b>posição</b>	<b>1c</b>	<b>2c</b>	<b>3c</b>
	0,083	0,088	0,085
	0,089	0,084	0,087
	0,084	0,084	0,084
desv.pad.	0,003	0,002	0,002
média	0,085	0,085	0,085
<b>desv.pad.</b>		<b>0,001</b>	
<b>média geral</b>		<b>0,085</b>	

O valor de 0,08T foi adotado para o CME produzido pelo equipamento.

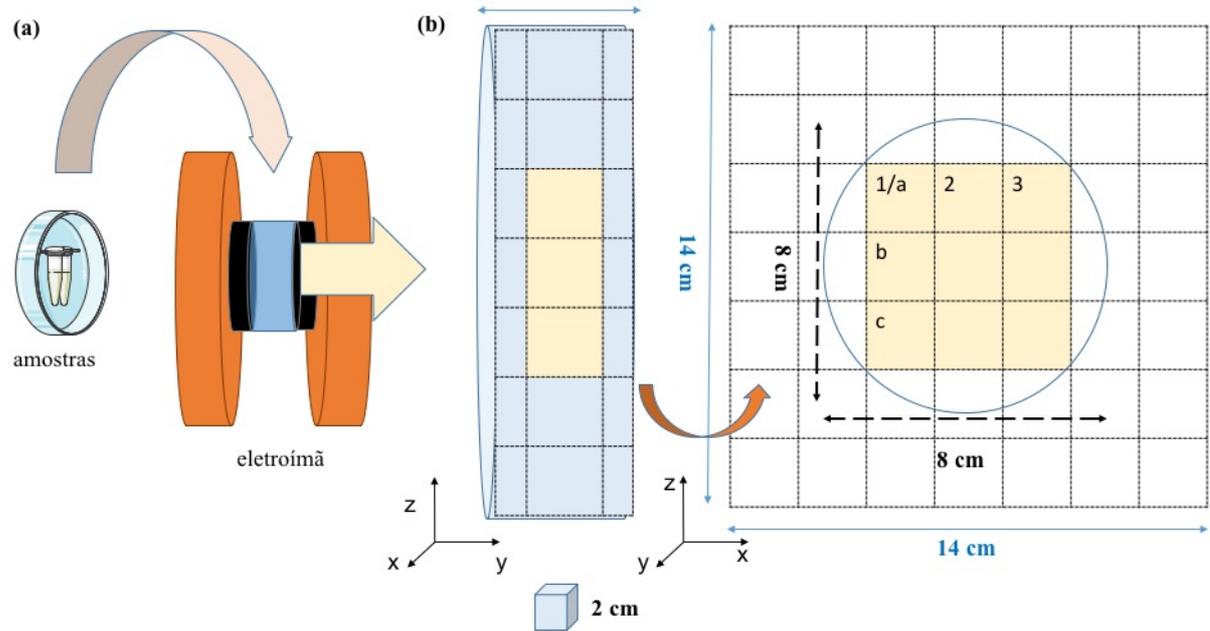
### 3.9.2.2 Medição da intensidade do Campo Magnético Estático produzido pelo eletroímã

As medições da intensidade do campo magnético estático produzido pelo eletroímã foram realizadas no Laboratório de Magneto-Óptica e Espectroscopia NãoLinear do Instituto de Física da USP, coordenado pelo Prof. Dr. Antonio Martins Figueiredo Neto por meio de um gaussímetro. Primeiramente, foi definido o espaçamento ideal entre as bobinas e o CME produzido. Esse equipamento produz um CME de 0,1 até 1 T, e essa variação é realizada pela mudança na corrente de entrada.

Na calibração, além da corrente de entrada, foram considerados os efeitos de borda e a distância entre as bobinas do eletroímã, pois a intensidade do CM é inversamente proporcional ao quadrado da distância. Desse modo, a geometria é determinante na precisão do CME aplicado nas amostras.

As duas amostras em tubos de microcentrífugas de 1 mL foram acomodadas em uma placa de Petri, que foi fixada a um braço de alumínio (Figura 23). Nessa configuração, as amostras ficaram restritas ao centro da área de ação do CME (Figura 23 – (b)). Nos testes exploratórios, a distância de quatro centímetros foi definida por gerar 0,8T em média a 90% da corrente de entrada (Tabela 8).

Figura 23- Esquema ilustrativo da exposição das amostras no CME do eletroímã. (a) posicionamento das amostras na área central da ação do CME; (b) na calibração propomos a divisão da área de ação do CME em cubos de 2cm.



Fonte: elaborado pela Autora.

Os resultados estão convertidos em Tesla:

Tabela 8 - Resultados das medições em 9 pontos diferentes na área central do eletroimã, com a média dos valores (Tesla-T) e o desvio padrão.

<b>posição</b>	<b>1a</b>	<b>2a</b>	<b>3a</b>
	0,86	0,86	0,83
	0,89	0,87	0,88
	0,86	0,88	0,85
desv.pad.	0,01	0,01	0,03
média	0,87	0,87	0,85

<b>posição</b>	<b>1b</b>	<b>2b</b>	<b>3b</b>
	0,82	0,89	0,88
	0,83	0,81	0,83
	0,87	0,87	0,82
desv.pad.	0,03	0,04	0,03
média	0,84	0,86	0,84

<b>posição</b>	<b>1c</b>	<b>2c</b>	<b>3c</b>
	0,86	0,86	0,85
	0,83	0,88	0,87
	0,87	0,87	0,86
desv.pad.	0,02	0,01	0,01
média	0,85	0,87	0,86

<b>desv.pad.</b>	<b>0,01</b>
<b>média geral</b>	<b>0,86</b>

Com base nessas medidas adotamos o valor de 0,8T para o CME produzido pelo eletroímã. Durante todo o experimento, além das amostras de controle, um termômetro acompanhou os testes a fim de averiguar a temperatura produzida pelos equipamentos. Assim, não foram obtidas diferenças significativas nas temperaturas no centro da área de ação dos CMEs, tanto com a utilização de eletroímã (0,8T), quanto com a utilização dos ímãs de neodímio (0,08T).

### 3.10 RADIAÇÃO GAMA

As amostras em meio líquido foram irradiadas com gamas em doses que variaram entre 0,5 e 13 kGy. Após a irradiação, as amostras líquidas foram diluídas e semeadas em placas com meio sólido de cultura (TGY) e inoculadas em estufas bacteriológicas por 48h.

Essas irradiações foram realizadas na *Gamma-Cell* do Centro de Tecnologia das Radiações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CTR-IPEN) da Comissão Nacional de Energia Nuclear- CNEN.

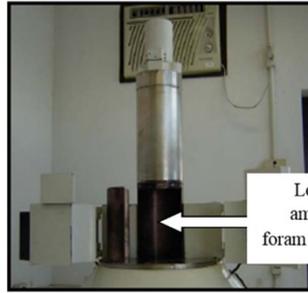
Tabela 9 - Características média da Gamma-Cell.

Capacidade Total	37 PBq (1 milhão de Curies)
Atividade Inicial de Operação	3,7 PBq (100kCi)
Sistema de Irradiação	<i>Product overlapping source</i>
Capacidade da Câmara	4,32 m <sup>3</sup>
Energia média - Co-60	1,25 MeV
Tempo a cada 2kGy	155min
Taxa de Dose	0,773 kGy/h
Formato da Fonte	4 $\pi$

Fonte: IPEN

As amostras teste foram acomodadas no equipamento e as amostras de controle ficaram ao lado do equipamento na ausência de luz.

Figura 24 - a esquerda foto da Gamma Cell alocada no IPEN; , a direita detalhe do local onde as amostras foram acondicionadas.



Local onde as amostras testes foram acondicionadas.

Fonte: do acervo da Autora

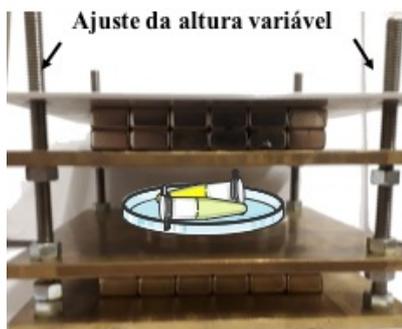
Os experimentos ocorreram no período de dois anos. Sendo assim, as irradiações com raios gamas tiveram taxas de dose diferentes e tempos de exposição variados.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 EQUIPAMENTO

O equipamento foi projetado para contemplar as peculiaridades deste projeto, descritas nos itens anteriores. Para tanto, determinamos as intensidades dos CME mais adequados, e projetamos as dimensões necessárias. Após a elaboração do desenho técnico das peças e escolha dos materiais, o equipamento foi construído pela oficina mecânica do Laboratório do Acelerador Linear- IFUSP, e montado pelo nosso grupo com o auxílio do grupo de eletrônica. A área e intensidade do CME foram estimadas por meio de um gaussímetro (equipamento que mede o CM em Gauss (G) –  $1T = 10.000\text{ G}$ ). O campo magnético médio é de  $0,08T$  (Figura 25)

Figura 25 - Foto do equipamento pronto para o uso de CME.



Fonte: elaborado pela autora.

### 4.2 CURVAS DE CRESCIMENTO

Na obtenção das curvas de crescimento das bactérias *D.radiodurans* e *E.coli* foi adotada a metodologia descrita anteriormente. Os meios de cultivo iniciais M2 (Meio 2 – Figura 19) foram triplicados. Assim, cada linhagem bacteriana teve uma triplicata. No sementeamento das placas optamos por três gotas de  $25\mu L$  da amostra diluída (Figura - 26) ao invés do espalhamento da cultura pela placa; dessa forma, tivemos também uma triplicata para cada meio M2. Os dados obtidos foram analisados e estão apresentados abaixo:

Figura 26 - Curvas de crescimento em função do tempo para as bactérias *D.radiodurans* e *E.coli*, obtidas por DO, absorvância ( $600nm$ ) com incerteza de 8%.

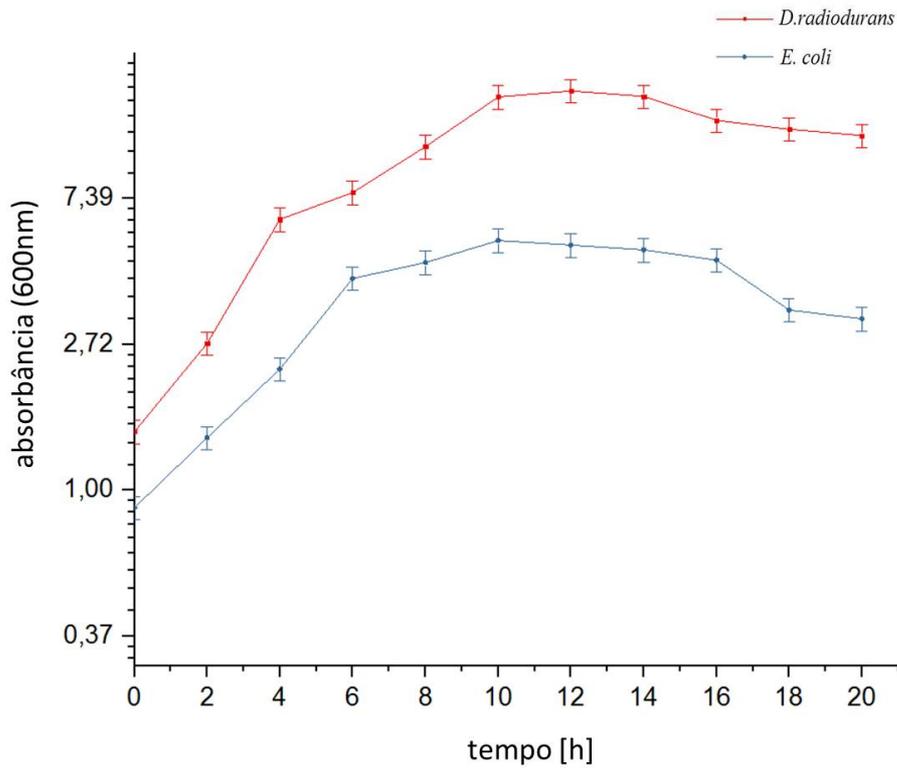


Figura 27 - Curva de crescimento em função do tempo para a bactéria *D. radiodurans* obtida por contagem das unidades formadoras de colônias de cada triplicata da amostra (T1, T2, T3), incerteza de 8%.

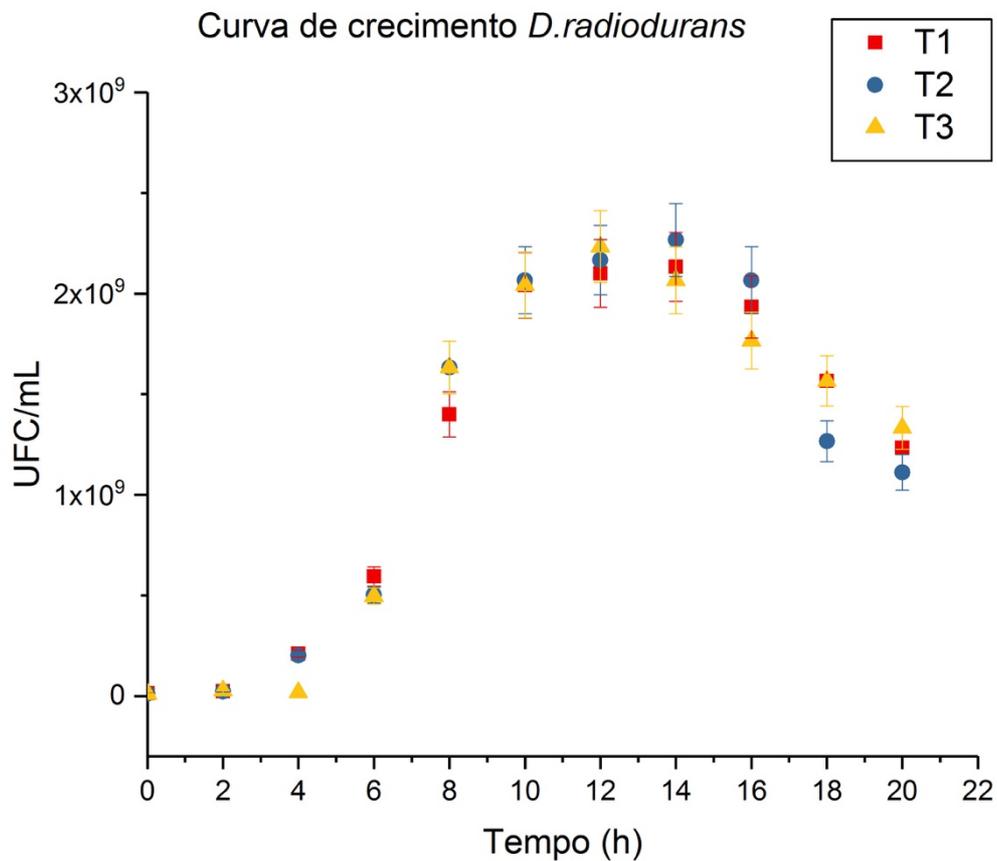
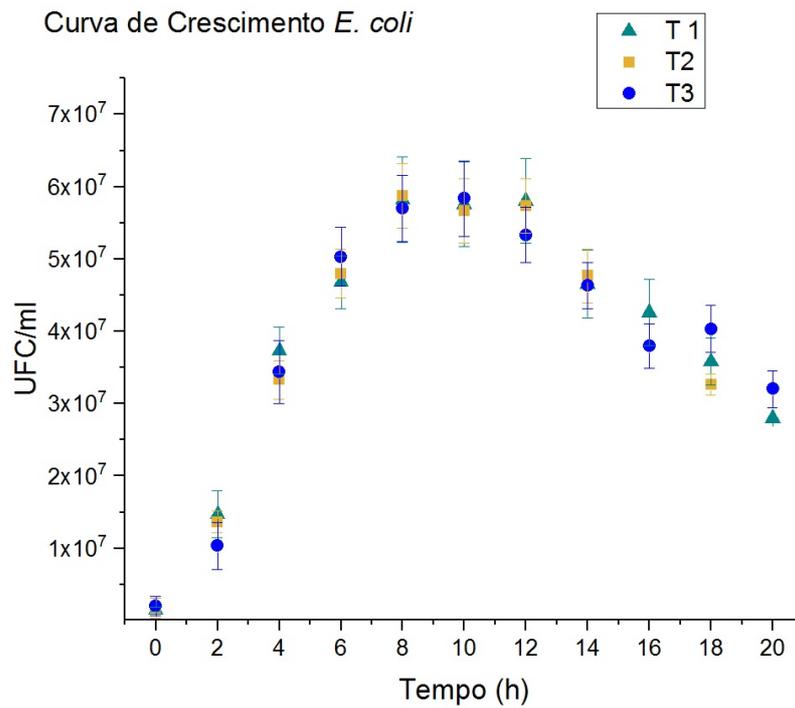


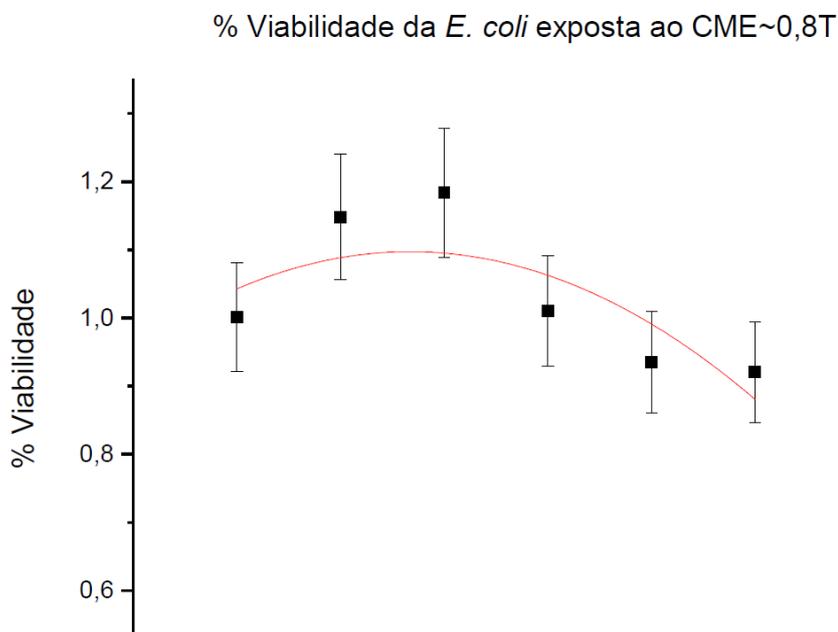
Figura 28 – Curva de crescimento de *E. coli*.



#### 4.3 VIABILIDADE

A viabilidade da bactéria *E. coli*, quando exposta a CME, foi observada durante sua fase exponencial. Por essa razão, o CME foi aplicado de uma a seis horas apenas. Assim, todo o experimento foi realizado dentro do período de maior atividade celular (Figura 29). A viabilidade foi obtida dividindo-se as amostras expostas pela amostra de controle, como descrito na metodologia.

Figura 29 - Gráfico da porcentagem da viabilidade bacteriana da *E. coli* sob a ação CME em função do tempo.

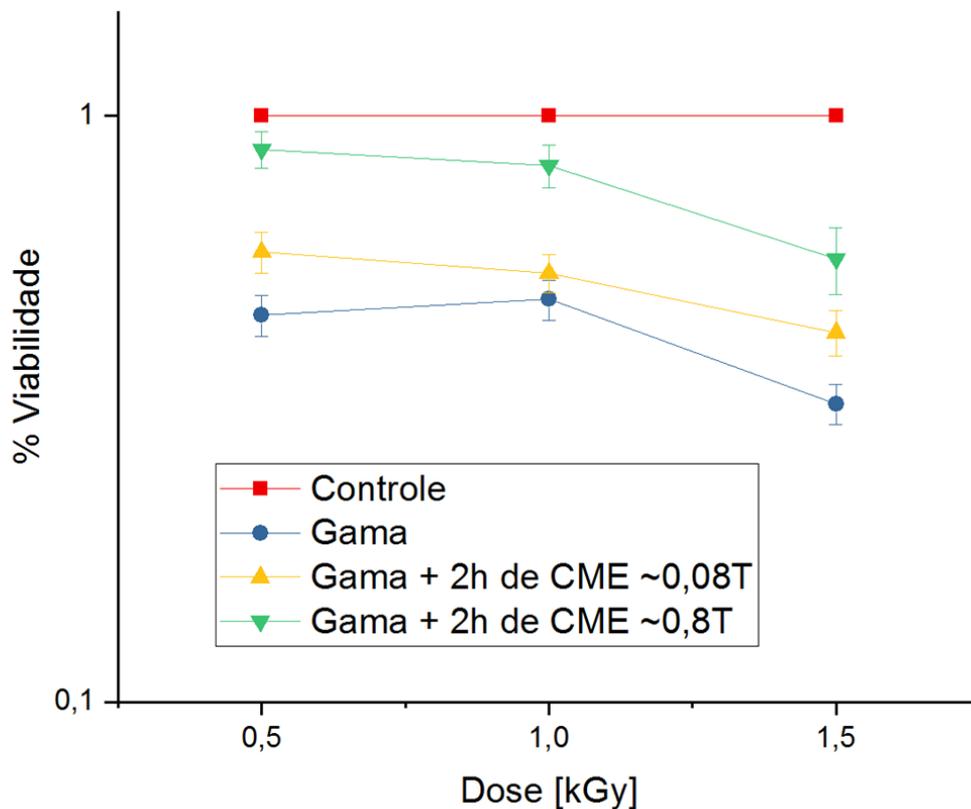


#### 4.4 EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO GAMA E CME

Averiguamos a viabilidade (UFC/ml) das culturas bacterianas depois da exposição à radiação gama e CME. As amostras em meio de cultura líquido foram irradiadas de 0,5 a 13 kGy e, em seguida, expostas aos CMEs de 0,08T e 0,8T.

A Figura 30 mostra a curva de viabilidade da *E. coli* (fase exponencial) em função da dose. As curvas intermediárias mostram o efeito do CME. Escolhemos essa bactéria como controle negativo dada sua maior radiosensibilidade, razão pela qual a maior dose de exposição foi de 1,5 kGy.

Figura 30 - Curva da viabilidade da *E. coli* em função da dose (kGy).



No gráfico (Figura 30) notamos que a ação do CME, independentemente de sua intensidade, tem efeito positivo na recuperação celular após a irradiação.

Experimentos exploratórios e de validação do experimento principal foram realizados. Os dados, estão no Apêndice - C.

As Figuras 31 e 32 mostram as curvas resultantes do experimento final de viabilidade da *D. radiodurans* em função da dose, e sob a ação dos CMEs.

Figura 31 - Curva da viabilidade do meio de cultivo M1 - *D. radiodurans* em função da dose (kGy).

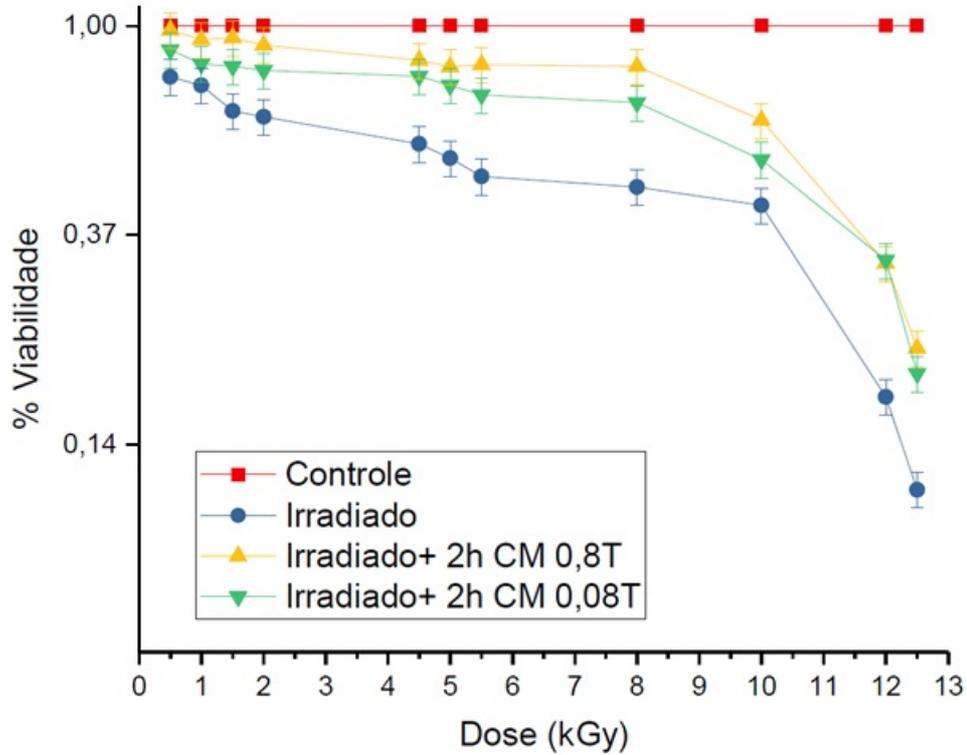
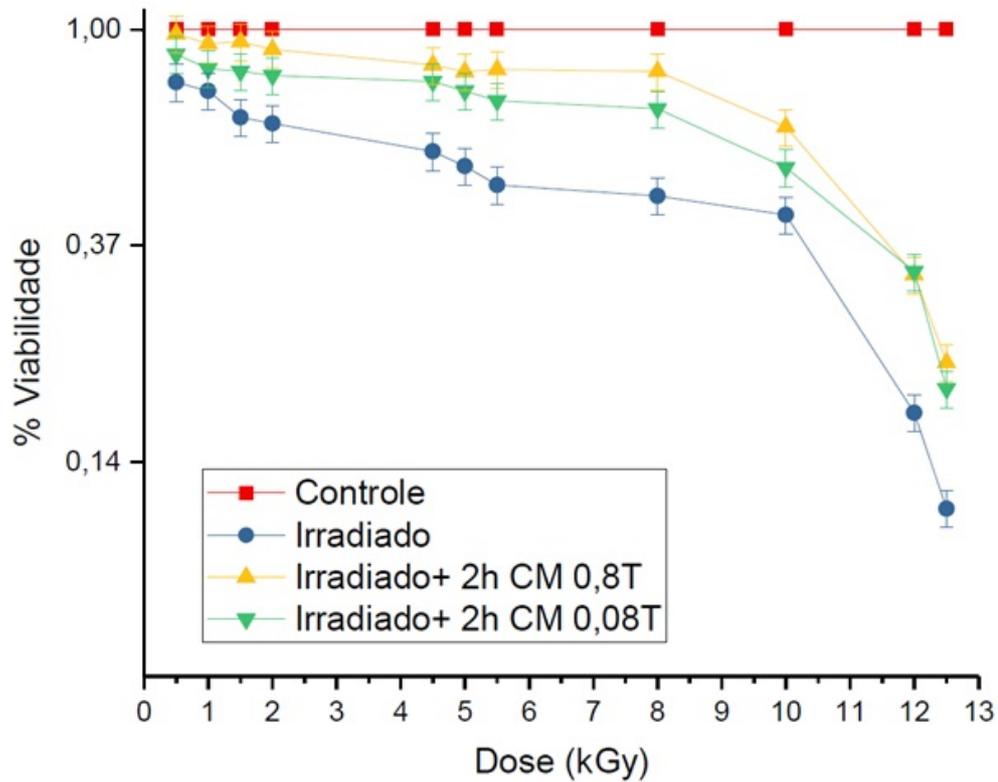


Figura 32 - Curva da viabilidade meio de cultivo M2 - *D. radiodurans* em função da dose (kGy).



Uma simples inspeção visual das funções de sobrevivência da *D. radiodurans* (Figuras 31 e 32) revela, principalmente, uma excepcional similaridade entre os dois conjuntos de dados experimentais, tanto na forma quanto no valor absoluto, dentro do intervalo dos erros experimentais. Igualmente importantes, esses dois conjuntos de dados foram obtidos de maneira independente e em triplicata nos dois casos. As Figuras 31 e 32, assim como os experimentos exploratórios, mostram que a **reprodutibilidade** é um dos pontos fortes deste trabalho.

#### 4.5 CÉLULAS IRRADIADAS E EXPOSTAS A CME – FUNÇÕES DE SOBREVIVÊNCIA

Os resultados obtidos a partir do experimento principal **sem** exposição a Campos Magnéticos Estáticos (CME), com doses de gamas entre 0 e 13 kGy, exibem a bem conhecida característica das funções de sobrevivência radiológicas da *D. radiodurans*, ou seja, um lento decréscimo até 8 kGy, aproximadamente, conhecido como o intervalo de doses em que os mecanismos de reparo ainda estão atuantes (trata-se do assim chamado *ombro de reparo*). Para doses superiores a 8 kGy, a função de sobrevivência exibe um acentuadíssimo decréscimo, decorrente da grande quantidade de danos infligidos ao DNA mais a desativação do conjunto de proteínas de reparo causada pela irradiação (SLADE; RADMAN, 2011).

Também, a exposição a CME com intensidades de 0,08T e 0,8T não provocou alterações na forma das curvas (funções) de sobrevivência, mas aumentou o valor absoluto dos resultados (Figuras 31 e 32). Esse inesperado resultado sugere fortemente que Campos Magnéticos Estáticos (CME), um agente físico exógeno, interferem positivamente, de alguma maneira, no processo de recuperação celular. Com a finalidade de quantificar e interpretar esse efeito biofísico, aqui observado pela primeira vez, define-se, a seguir, o *Coefficiente de Recuperação Celular*

Equação 12 - Coeficiente de Recuperação Celular.

$$R(B) = [S(\gamma + B)/S(\gamma)]. 100, \text{ em que } B = 0,08T \text{ ou } 0,8T. \quad (12)$$

As Figuras 33 e 34 exibem  $\langle R \rangle$ , o valor médio dos *Coefficientes de Recuperação Celular* calculados a partir dos dados de viabilidade (Figuras 31 e 32). Também é mostrado nessas Figuras o valor médio da sobrevivência celular,  $\langle S\% \rangle$ , igualmente calculado a partir dos dados primários (Figuras 31 e 32). A curva contínua  $\langle R(D) \rangle$  (curva amarela) representa uma função estatística fenomenológica ajustada ao dados experimentais (detalhes em 5.2).

Figura 33 - Coeficiente de Recuperação Celular para B=0,8T

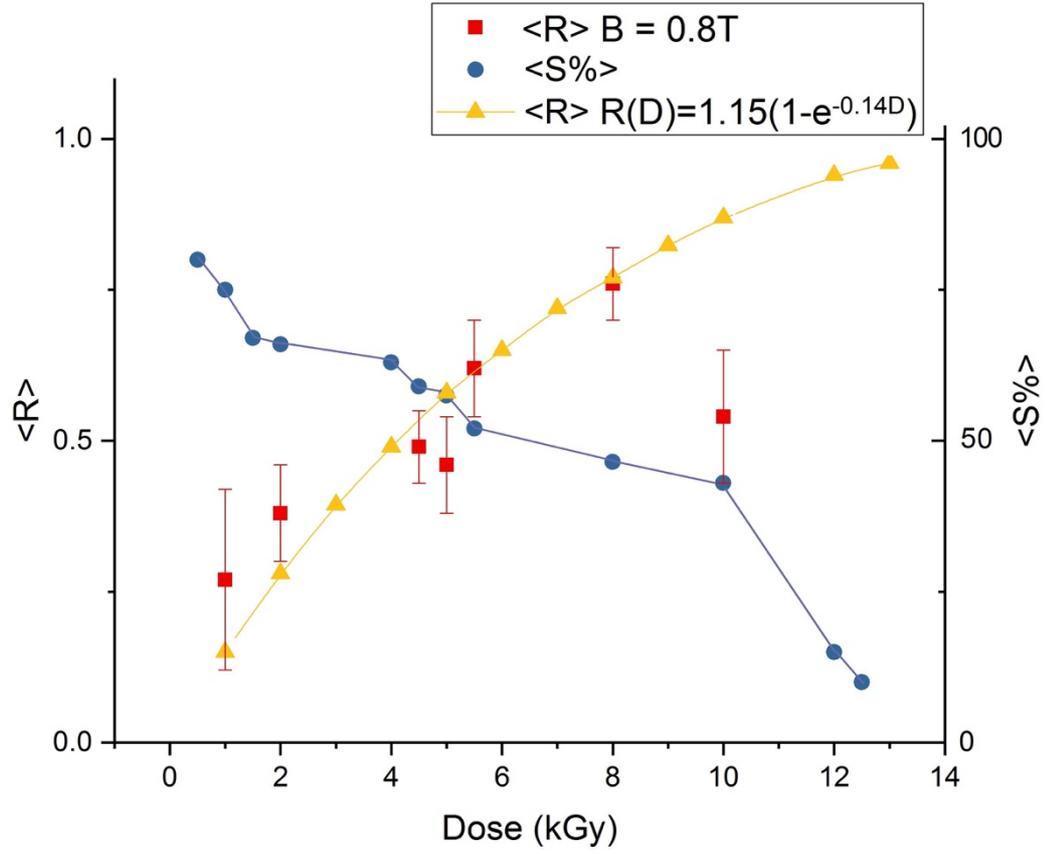
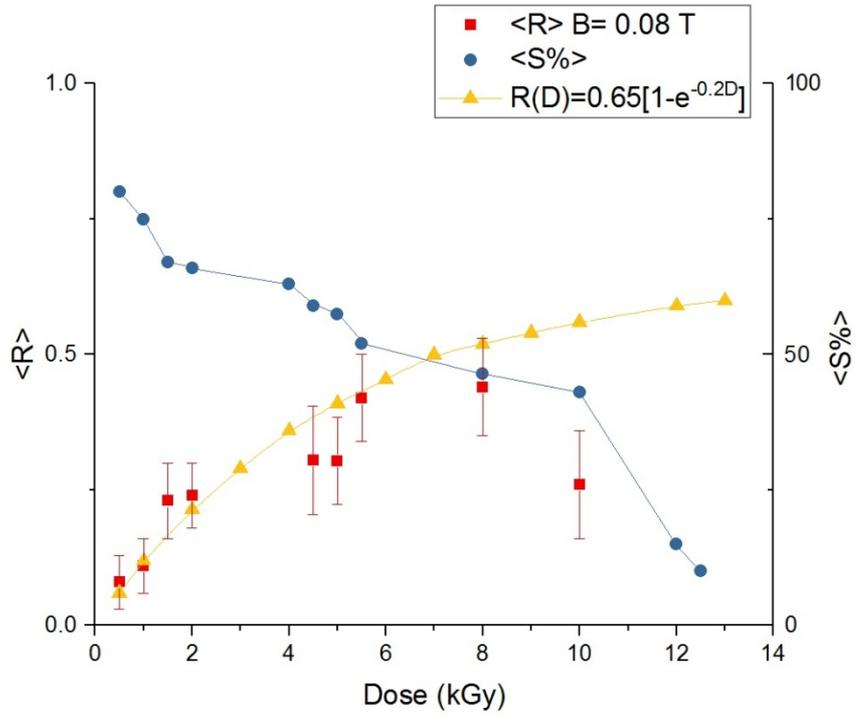


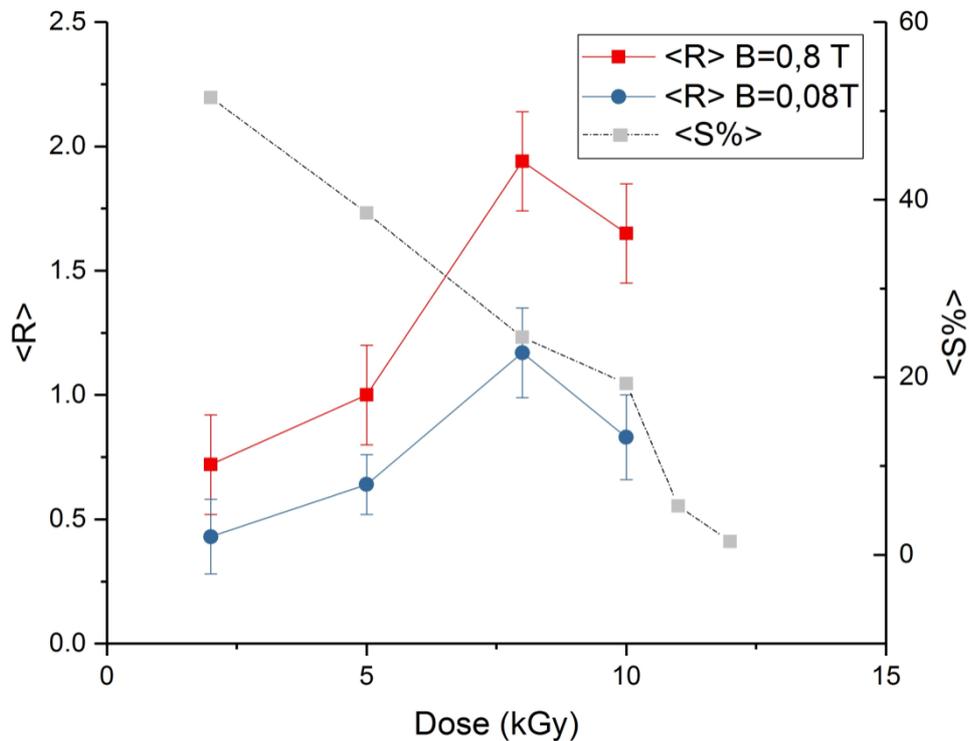
Figura 34 - Coeficiente de Recuperação Celular para B=0,08T



#### 4.6 COEFICIENTE DE RECUPERAÇÃO CELULAR

Foram calculados valores médios referentes aos resultados obtidos para  $R(B)$ , Equação 12, e para  $S(\gamma)$ , (Figuras 33 e 34), definidos por  $\langle R \rangle$  e  $\langle S\% \rangle$ , respectivamente, e mostrados na Figura 35 para algumas doses representativas.

Figura 35 - Valores médios dos coeficientes de recuperação celular.



As características mais evidentes associadas a  $\langle R(B) \rangle$  *vis-à-vis*  $\langle S(\gamma) \rangle$  são:

[a] Exceto quanto ao valor absoluto, o comportamento de  $\langle R(B) \rangle$  nas duas intensidades de CME é muito similar.

[b]  $\langle R(B) \rangle$  aumenta monotonicamente até 5 kGy, seguido por um aumento muito acentuado de 5 a 8 kGy.

[c] Um máximo de  $\langle R(B) \rangle$  é alcançado em 8 kGy, que para  $D > 8$  kGy decresce acentuadamente atingindo em  $D > 12$  kGy valores apenas residuais.

[d] O Coeficiente de Recuperação Celular  $R(B)$ , Equação 12, não responde linearmente em função da intensidade do campo magnético B. Quando B é aumentado de uma ordem de grandeza, de 0,08T a 0,8T, a correspondente recuperação celular aumenta em média apenas 20%.

#### 4.7 RESULTADOS DO CONTROLE NEGATIVO (*E. coli*)

A Figura 30 indica, claramente, que a ação do Campo Magnético Estático (CME) induziu a um aumento da viabilidade da *E. coli*. Além disso, esse aumento foi bem maior para o campo de maior intensidade, fortemente sugerindo que a recuperação celular é função da intensidade do CME.

#### 4.8 FUNDAMENTOS TEÓRICOS *ad-hoc*

Conforme comentado acima, o DNA de *D. radiodurans* exposto a altas doses de radiação gama fragmenta-se num grande número de pequenos pedaços, os mais abundantes com comprimentos entre 50 e 100 nm (SLADE; RADMAN, 2011), (GONZÁLEZ, 2012). Esses fragmentos, pequenos e carregados, são produzidos por quebra dupla da fita de DNA. Assim, um Campo Magnético Estático  $\vec{B}$  interagindo com **cargas móveis** pode apenas induzir nestas a execução de movimentos circulares, em que cada carga ( $q$ ) fica submetida a uma força dada pela Equação 1.

Uma vez que  $\vec{F}_m$  é perpendicular a  $\vec{v}$  a trajetória resultante é circular, e o raio dessa trajetória é inversamente proporcional à intensidade de  $\vec{B}$ . Alternativamente, a ação de  $F_m$  pode ser descrita pela indução de um torque dado por

Equação 13 -Torque realizado pela força magnética.

$$\vec{\tau}_a = \vec{r} \wedge \vec{F}_m \quad (13)$$

em que  $\vec{r}$  é o vetor posição de  $q$  relativamente ao centro da trajetória.

Uma vez que cada fragmento de DNA não se candidata à aproximação “puntiforme”, sua grandeza representativa é o Momento de Inércia  $I_{in}$  desse fragmento que, sob a ação de  $\vec{\tau}_a$ , adquire aceleração angular dada por

Equação 14 -Aceleração angular resultante do torque.

$$\alpha = \frac{\tau_a}{I_{in}} \quad (14)$$

Conforme comentado na Introdução, nas condições experimentais de altas doses deste estudo, o DNA celular de *D. radiodurans* é fragmentado num grande número de pequenos fragmentos. Nesse caso, os Momentos de Inércia desses fragmentos ( $I_{in}$ ) são relativamente bem menores do que o Momento de Inércia do genoma íntegro. Com isso, as acelerações (Equação 14) experimentadas pelos fragmentos serão comparativamente bem maiores do que aquelas da maioria das moléculas intracelulares.

## 5. DISCUSSÃO

O material apresentado nesta seção está organizado como:

- 1- FATOS, constituídos pelos Resultados **deste trabalho** e por dados *ad-hoc* da **literatura**.
- 2- Suporte TEÓRICO, tendo por base propriedades bem estabelecidas decorrentes da exposição de macromoléculas a Campos Magnéticos Estáticos.
- 3- INTERPRETAÇÃO dos dados mediante a interligação dos Fatos com o suporte Teórico, mais a argumentação com base em conceitos biológicos associados à reconexão dos cromossomos de *D. radiodurans* fragmentados pela radiação. Conforme discutido por ZAHRADKA *et al.*, (2006), a recuperação de *D. radiodurans* é realizada pela **reconexão homóloga** de cromossomos fragmentados.

Os resultados representados pelo Coeficiente de Recuperação Celular (Equação 12, Figuras 33 e 34) levantam a seguinte questão: **de que maneira um Campo Magnético Estático interferiria em um mecanismo de recuperação baseado em reconexão homóloga e de que forma torná-lo mais eficiente ?**

### 5.1 A RACIONALIDADE DOS RESULTADOS OBTIDOS

#### 5.1.1 Conceitos de apoio

Levando-se em consideração o arrazoado físico apresentado nos parágrafos acima, a exposição de *D. radiodurans* à radiação ionizante e CME enseja a apreciação e discussão dos seguintes pontos necessários à interpretação dos resultados:

- [i] Produção, em nível genômico, de pequenos fragmentos de DNA **com carga elétrica** total não nula.
- [ii] **Trajétórias circulares** como o único tipo de movimento induzido por CME nesses fragmentos de DNA.
- [iii] Pequenos Momentos de Inércia dos fragmentos de DNA relativamente ao genoma íntegro. Então, a exposição desses fragmentos a Campos Magnéticos intensos os levaria a percorrer trajetórias circulares com **raios pequenos**.
- [iv] Em decorrência de [i, ii e iii], haveria um “congestionamento” de inúmeros fragmentos de DNA, que estariam compelidos a mover-se em trajetórias circulares com raios pequenos. Isso

facilitaria o emparelhamento homólogo entre os fragmentos, circunstância essa que está no cerne do **processo de recuperação**.

[v] Uma vez que um Campo Magnético ilumina igualmente todos os fragmentos de DNA, o Coeficiente de Recuperação Celular (R) deveria ser, obviamente, proporcional ao número de fragmentos ( $N_f$ ), ou seja,  $R \sim N_f$ . Contudo,  $S \sim \frac{1}{N_f}$ , um bem conhecido **conceito radiobiológico** (ALPEN, 1990), que leva a  $R \sim \frac{1}{S}$ .

Esse conceito radiobiológico diz, em outras palavras, que a recuperação (R) tão mais eficiente será, quanto maior for o número de fragmentos para reconectar ( $N_f$ ). Um grande número de fragmentos para reconectar reflete-se em uma pequena sobrevivência celular (S). Portanto, quanto maior for S, menor será R (Figuras 33 e 34).

### 5.1.2 Interpretação física da Reabilitação Celular

Foram listadas as mais relevantes **características** dos resultados representados por  $\langle R(B) \rangle$ , o Coeficiente de Recuperação Celular Médio (Figura 35).

Discute-se, a seguir, a racionalidade de todas essas **características** em termos do arrazoado físico já apresentado:

**Característica [a]** – *Exceto quanto ao valor absoluto, o comportamento de  $\langle R(B) \rangle$  nas duas intensidades de CME é muito similar.*

(1) Conforme discutido,  $R \sim \frac{1}{S}$ , em que S, portanto, determina a forma da curva  $R(B) \times D$  (Figuras 33 e 34). Sendo S o *input* comum nas exposições às duas intensidades de CME, a forma das correspondentes duas curvas  $R(B) \times D$  deverá ser a mesma.

(2) A ação dos CME com intensidades  $B_1$  e  $B_2$  (0,08T e 0,8T, respectivamente) sobre os fragmentos de DNA resulta na indução de movimentos circulares desses fragmentos com raios  $r_{B1}$  e  $r_{B2}$ , respectivamente.

(3) A ação isolada de um CME não altera o número de fragmentos de DNA – estes são produzidos no processo de irradiação.

(4) O fato de  $B_1 < B_2$  implica  $r_{B1} > r_{B2}$  que, de acordo com 5.1.1–[iv], facilitaria a reconexão homóloga dos fragmentos de DNA resultando, portanto, em  $R(B_2) > R(B_1)$ , como inquestionavelmente demonstrado pelos resultados experimentais (Figuras 31, 32, 33 e 34).

**Característica [b]** –  $\langle R(B) \rangle$  aumenta monotonicamente até 5 kGy, seguido por um aumento muito acentuado de 5 a 8 kGy.

Conforme deduzido em 5.1.1-[v],  $R \sim \frac{1}{S}$ . Logo o acentuado aumento de  $\langle R(B) \rangle$ , de 5 a 8 kGy, é decorrência de um igualmente acentuado decréscimo de S nesse intervalo de doses.

**Característica [c]** – Um máximo de  $\langle R(B) \rangle$  é alcançado em 8 kGy, e para  $D > 8$  kGy decresce acentuadamente, atingindo em  $D > 12$  kGy valores residuais.

(1) A Tabela 10 mostra que a função de sobrevivência **média** da *D. radiodurans*, cujo valor médio foi obtido dos dois conjuntos de dados (Figuras 31 e 32),  $\langle S \rangle$ , exibe um acentuado **decréscimo** no intervalo 5 – 8 kGy (Figuras 33 e 34), aumentando em muito, portanto,  $\langle R(B) \rangle$ .

Tabela 10 – Dados da função de sobrevivência média da *D. radiodurans*

B(T) \ $\Delta D$ (kGy)	2-5	8-10
$\langle S \rangle$	0.61	0.45
0.8 $\langle R_1 \rangle$	0.28	0.35
0.08 $\langle R_2 \rangle$	0.44	0.65

(2) A partir de 8 kGy  $\langle S \rangle$  decresce abruptamente de ~ 20% até ~ 0% em 12 kGy. Em decorrência, o número de células não viáveis converge para um número residual de células danificadas.

**Característica [d]** – O Coeficiente de Recuperação Celular  $R(B)$ , Eq. 9 não responde linearmente em função da intensidade do campo magnético B. Quando B é aumentado de uma ordem de grandeza, de 0,08T a 0,8T, a correspondente recuperação celular aumenta em média apenas 20%.

(1) O papel desempenhado pelos CMEs, conforme descrito e discutido no parágrafo 5.1.1-[iv]), é **compactar** os fragmentos de DNA em pequenas e limitadas regiões no interior celular. Essa circunstância facilitaria a reconexão homóloga dos fragmentos.

(2) As dimensões dessas regiões de compactação de fragmentos são da ordem de  $r_B$ , o raio dos movimentos circulares induzidos pelos CMEs nos fragmentos de DNA.

(3) Quanto maior for a intensidade dos CMEs, menor seria  $r_B$  e, conseqüentemente, maior seria o módulo de  $R(B)$ .

(4) Contudo, a dinâmica desenrolando-se no interior celular corresponde a movimentos num **meio viscoso**, o que torna respostas lineares incertas em curtos períodos de tempo (detalhes no APÊNDICE A).

## 5.2 REVELANDO A NATUREZA *ESTOCÁSTICA* DOS RESULTADOS PARA R(D)

É proposta a seguir uma avaliação conceitual quanto à **natureza estocástica** da reconexão dos fragmentos de DNA, bem como sua validação a partir dos resultados experimentais para R(D) ora obtidos. As hipóteses de partida são: (1) a fragmentação de DNA induzida pela radiação ionizante é randômica, e (2) todos os fragmentos possuem, aproximadamente, a mesma probabilidade de reconexão.

O arranjo experimental do presente experimento permite que um CME *ilumine* igualmente todos os fragmentos produzidos no processo de irradiação (*Materiais e Métodos*). Nesse caso, o *Coefficiente de Recuperação Celular R(D)* deveria ser proporcional ao número de fragmentos de DNA ou, equivalentemente, ao número de células danificadas pela radiação,  $N_d$ . Então,

Equação 15 - Coeficiente de Recuperação Celular R(D).

$$R(D) \sim N_d(D), \text{ ou, } R(D) = K \cdot N_d(D) \quad (15)$$

sendo K a constante de proporcionalidade.

Especificamente, K é uma grandeza fracionária entre 0 e 1, e expressa a *Eficiência de Recuperação* pois,  $K = 0$  corresponde a recuperação zero ( $R=0$ ), enquanto  $K = 1$  significa que todas as células danificadas foram recuperadas ( $R = N_d$ ), ou seja, 100% de *Eficiência de Recuperação*. K, evidentemente, é função das peculiaridades da interação entre o *agente físico exógeno* (CME, neste caso) e a *população de células danificadas*,  $N_d$ .

Se  $N_0$  for o número de células no início da irradiação (quando  $D = 0$ ), o número de células viáveis é descrito pela seguinte *função de sobrevivência* (detalhes no APÊNDICE-B),

Equação 16 - Função de sobrevivência.

$$N_S(D) = N_0 \cdot e^{[-\lambda \cdot D]} \quad (16)$$

Portanto,  $N_d(D) = N_0 - N_S(D)$ , e substituindo na Equação 12,

Equação 17 - Coeficiente de Recuperação Celular R(D) ajustado.

$$R(D) = R_0 \cdot [1 - e^{(-\lambda \cdot D)}], \text{ com } R_0 = K \cdot N_0. \quad (17)$$

A Figura 33 exhibe os resultados experimentais de R(D) para  $B = 0,8T$ , mais a função fenomenológica para R(D), Equação 17, obtida por um ajuste de mínimos quadrados bi-paramétrico (parâmetros  $R_0$  e  $\lambda$ ) resultando, para o CME de  $0,8T$ :

Equação 18 - parâmetros  $R_0$  e  $\lambda$ , para o CME  $B=0,8T$ .

$$R_0 = 1,15 \pm 0,15 \text{ e } \lambda = 0,14 \pm 0,05 \text{ (kGy)}^{-1} \quad (18)$$

Assim,

Equação 19 - Coeficiente de Recuperação Celular R(D) ajustado aos parâmetros  $R_0$  e  $\lambda$ , no CME  $B=0,8T$ .

$$R(D) = 1,15[1 - e^{(-0,14D)}] \quad (19)$$

Nos parâmetros do CME de intensidade B=0,08T:

Equação 20 - parâmetros  $R_0$  e  $\lambda$ , no CME B=0,08T.

$$R_0 = 0,65 \pm 0,05 \text{ e } \lambda = 0,20 \pm 0,06 \text{ (kGy)}^{-1} \quad (20)$$

Finalmente,

Equação 21 - Coeficiente de Recuperação Celular R(D) ajustado aos parâmetros  $R_0$  e  $\lambda$ , no CME B=0,08T.

$$R(D) = 0,65[1 - e^{(-0,2D)}] \quad (21)$$

Levando-se em consideração as incertezas experimentais associadas a R(D), mais o número de pontos (cinco, origem inclusive), é razoável concluir que as funções ajustadas (Equações 19 e 21) descrevem a *natureza estatística* do *Coeficiente de Recuperação Celular* (Equação 12).

O significado da constante de *Probabilidade Relativa*  $\lambda$  no Espaço-de-Fase, como determinado pela Equação- B-2 (APÊNDICE-B), isto é:

Equação 22 - Probabilidade Relativa  $\lambda$  no Espaço-de-Fase.

$$\left(\frac{1}{N_S}\right) \cdot \left(\frac{dN_S}{dD}\right) = -\lambda, \quad (22)$$

é muito claro: a **probabilidade**, por unidade de intervalo de dose e por unidade de células sobreviventes, **é a mesma em todas as doses**.

Portanto, e de acordo com o arcabouço teórico fenomenológico aqui proposto e desenvolvido, o aumento da viabilidade de *D. radiodurans* induzido pela exposição a CMEs é consequência de uma maior eficiência do mecanismo de reconexão dos fragmentos de DNA expostos aos campos magnéticos. Trata-se de um processo, conforme discutido, acentuadamente determinado por uma **componente estocástica**.

A constante  $\lambda$  é propriedade **unicamente** do sistema estudado (amostras de células de *D. radiodurans*, neste caso), em que  $\lambda^{-1} = D_0 = 5\text{kGy}$  é a dose necessária para danificar 63% da população inicial de células  $N_0$ , ou seja  $N_s(D) = 0,37.N_0$ .

É importante frisar que a **caracterização estatística** de dados requer, também, a correta identificação do *processo estocástico subjacente*. Contudo, de acordo com a fenomenologia desenvolvida neste trabalho, a natureza estatística de R(D) está diretamente associada à **estocasticidade do processo de reconexão** dos fragmentos. Essa estocasticidade na reconexão homóloga está intimamente associada a um tipo de *Movimento Browniano* desses fragmentos. Dada a especificidade físico-matemática desse processo, esse tópico será desenvolvido em estudos posteriores do grupo.

## 6. CONCLUSÕES

### [I] Com base na observação dos Resultados Experimentais

1. A exposição de células de *D. radiodurans* a altas doses de radiação e, em seguida, a Campos Magnéticos Estáticos, **umenta sua viabilidade**.

# Esse resultado é o mais **importante e intrigante** deste estudo, principalmente porque, com as altas doses empregadas, o DNA de *D. radiodurans* é severamente fragmentado.

2. A recuperação das células irradiadas é proporcional à intensidade de *B*, demonstrando, assim, a participação direta desse agente físico exógeno (CME) no processo.

# Isso demonstra que o **aumento de viabilidade** é decorrência da ação de uma **interação física** que potencializa um processo **biológico** (a reconexão homóloga dos fragmentos).

3. O conjunto das células irradiadas perde suas características biológicas e físicas em doses **superiores a 10 kGy**, resultando em ineficiência da recuperação operada pelos CMEs e consequente **colapso dos mecanismos** de sobrevivência celular.

# Define-se, então, uma **dose de corte** (*cut-off*) igual a 10 kGy, dado de importância para aplicações **radiobiológicas**.

[II] (a) A partir de bioconceitos bem estabelecidos, (b) mais a Física subjacente às interações magnéticas e (c) resultados experimentais anteriores (do Grupo e da literatura).

1. A natureza do processo de recuperação celular (**aumento da viabilidade**) é *estatística*.  
# Demonstração apresentada nas Figuras 33 e 34.

2. O **processo estocástico** subjacente, responsável pela **caracterização estatística** da recuperação celular, é a **reconexão dos fragmentos** de DNA.

3. **Campos Magnéticos Estáticos** (CMEs) e exógenos são responsáveis pelo inesperado e substancial **aumento da viabilidade** de *D. radiodurans*.

# CMEs **compactam** os fragmentos de DNA em pequenas e limitadas regiões no interior celular, facilitando sua reconexão. Essa circunstância é denominada em Física de **aumento do espaço-de-fase**, disponível para a reconexão dos fragmentos.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS DE RELEVÂNCIA

1. Os dados experimentais obtidos neste trabalho apresentaram uma **alta reprodutibilidade**.

2. Projetou-se e construiu-se um equipamento para a geração de Campos Magnéticos Variáveis (CMV) a partir de Campos Magnéticos Estáticos (CME). Trata-se de um artefato motorizado **original**. Esse equipamento será utilizado nas fases de prosseguimento desta linha de pesquisa.

### 7.1 CAMPOS MAGNÉTICOS ENDÓGENOS E EXÓGENOS

Embora este trabalho tenha tratado da ação de Campos Magnéticos Exógenos, é importante frisar que Campos Magnéticos **Endógenos** interagem com as mesmas características físicas observadas nos exógenos.

Uma das funções mais importantes que Campos Magnéticos **Endógenos** podem ter em Biologia envolve aquela de impor trajetórias radiais e acelerações em cargas elétricas na transposição do DNA e/ou hélices de proteínas.

Além disso, Campos Magnéticos **Endógenos** também podem exercer influências mais genéricas, como a aplicação de torque, que pode ser funcional em **motilidade celular**.

## 8. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. *Biologia Molecular da Célula*, 5ª edição, Brasil, **Artmed**, 2009.

ALPEN, J. E. *Radiation Biophysics*. **Prentice-Hall International**, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey; 1990.

AMARA, S. et al. Influence of a static magnetic field (250 *mT*) on the antioxidante response and DNA integrity in THP1 cells. **Phys. Med. Biol.** v. 52, p. 889-898, 2007.

ANDERSON, A. W. et al. Studies on a radio-resistant micrococcus. I. isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. **Food Technology**, v. 10, p. 575-578, 1956.

ANDRETTE, R. O. **Efeito de campos elétricos exógenos em células tumorais - utilização em quimioterapia de células melanocíticas** B16F10.113f Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo, São Paulo 2012.

ARRUDA-NETO, J. D. T. et al. Static electric fields interfere in the viability of cells exposed to ionizing radiation. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 85, n. 4, p. 314–321, Apr. 2009.

ARRUDA-NETO J. D. T. et al. Using accelerator electron beams to induce massive cell killing in the extremophilic *Deinococcus radiodurans*. **WebmedCentralplus BIOPHYSICS** 1970;39(1):WMCPLS00263, 2013. Disponível em: <[https://www.webmedcentralplus.com/wmcpluspdf/Article\\_WMCPLS00263.pdf](https://www.webmedcentralplus.com/wmcpluspdf/Article_WMCPLS00263.pdf)>. Acesso em: 17 mar. 2018.

ARRUDA-NETO J. D. T. et al. Radio Sensitization By Static Electric Fields Is Observed In The Extremophilic *Deinococcus Radiodurans* Exposed To Gamma Radiation. **WebmedCentral plus BIOPHYSICS** 1970;-39(1):WMCPLS00385, 2014. Disponível em: <[https://www.webmedcentralplus.com/wmcpluspdf/Article\\_WMCPLS00385.pdf](https://www.webmedcentralplus.com/wmcpluspdf/Article_WMCPLS00385.pdf)>. Acesso em: 01 jan. 2019.

BARNOTHY JM; BARNOTHY MF; BOZORMENYI-NAGY I. Influence of a magnetic field upon the leukocytes of the mouse. **Nature**, 1956. 1785-1786 p. 181v.

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

EISBERG, R.; RESNICK, R. *Física quântica: Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas*- Rio de Janeiro: **Elsevier**, 35ª reimpressão, 1979.

FEYNMAN, R.; LEIGHTON, R. B.; SANDS M. *Lições de Física de Feynman*. Brasil, Bookman, v.2 e 3, 2008.

GONZÁLEZ, L.N. et al. DNA fragmentation by gamma radiation and electron beams using atomic force microscopy. **J Biol Phys**, v. 38, p 531–542, 2012.

IMAMURA, M. et al. Synergistic cell-killing effect of a combination of hyperthermia and heavy ion beam irradiation: In expectation of a breakthrough in the treatment of refractory cancers (Review). **Int. J. Mol. Medicine**, n. 9, p. 11-18, (2002).

LANGE, K. Microvillar Ion Channels: Cytoskeletal Modulation of Ion Fluxes, **Journal of Theoretical Biology**, v. 206, p. 561-584, 2000.

MARDIGAN, M.; MARTINKO J. et al. Microbiologia de Brock. Porto Alegre, **Artmed**. 14ed, 2016.

MÄRK, T.D.; SCHEIER, P. Unexpected electrons. **Nature Physics**, v.6, p.82-83, February 2010.

MIHOUB M., MAY A.E. Effects of static magnetic fields on growth and membrane lipid composition of *Salmonella typhimurium* wild-type and dam mutant strains, **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, p. 259–266, 2012.

MILLER HJ, A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1992.

NELSON, D.L.; COX M.M. Lehninger: Principles of Biochemistry, 3<sup>a</sup> edição, **Worth Publishers**, p. 369-370, 2000.

OKUNO, E.; YOSHIMURA, E.M. Físicas das radiações, São Paulo: **Oficina de Textos**, 2010.

OREAR J. **Fundamental Physics**. 2<sup>a</sup> edição, **John Wiley e Sons Inc**, 1967.

PRADO, G.R. **Estudo da resistência de *Deinococcus radiodurans* à ação combinada de radiações ionizantes com campos elétricos ou magnéticos exógenos**. 200 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PURCELL, E. M. Curso de Física de Berkeley. Eletricidade e Magnetismo. São Paulo: **Edgard Blücher**, v.2, 1973.

ROSEN AD, Mechanism of Action of Moderate-Intensity Static Magnetic Fields on Biological Systems, **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 39, p. 163–173, 2003.

SLADE, D.; RADMAN, M. Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.75, p. 133-191, 2011.

TENUZZO, B.; CHIONNA, A. Biological Effects of 6mT Static Magnetic Fields: A comparative Study in Different Cell Types. **Bioelectromagnetics**, Italy, v. 27, p. 560-577, 2006.

USSELMAN, R. J. et al. The Quantum Biology of Reactive Oxygen Species Partitioning Impacts Cellular Bioenergetics. *Scientific Reports/ nature*, 2016 - DOI: 10.1038/srep38543.

YU, S.; SHANG, P. A review of bioeffects of static magnetic field on rodent models. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, China, v. 114, p. 14-24, 2014.

ZAHRADKA, K. et al. Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. *Nature*, v. 443, p.569–573, 2006.

## APÊNDICE A- Velocidade do fragmento

Considera-se, genericamente, uma célula exposta a um Campo Magnético uniforme  $B$ . Após irradiação com altas doses de gamas, cada fragmento de DNA (de massa  $m$ ) no interior celular ficará sujeito simultaneamente a uma Força Magnética constante  $F_m(B)$  e a uma força viscosa  $f$ . Supondo que a força viscosa seja proporcional à velocidade, e que  $\gamma$  seja o coeficiente de viscosidade do citosol,  $f = \gamma v$ .

Da Dinâmica (Segunda Lei de Newton)

$$F_m - f = m \cdot a \quad \rightarrow \quad F_m - \gamma v = m \frac{dv}{dt}, \text{ cuja solução é} \quad \text{A-1}$$

$$v(t) = \frac{F_m}{\gamma} \cdot \left\{ 1 - e^{\left[-\frac{\gamma}{m}t\right]} \right\} \quad \text{A-2}$$

Portanto, a velocidade de cada fragmento crescerá assintoticamente até estabilizar, em média, no valor  $\frac{F_m}{\gamma}$ , após exposição ao Campo Magnético.

## APÊNDICE B- Probabilidade no espaço de fase

Denomina-se por  $N(D)$  o número de células sobreviventes após irradiação com uma dose  $D$ . Se a dose for aumentada de um incremento diferencial  $dD$ , o número de células sobreviventes sofrerá um decréscimo  $dN_s$ , ou seja,

$$dN_s = N_s(D + dD) - N_s(D) < 0 \quad \text{B-1}$$

$dN_s$  é simultaneamente proporcional a  $N_s(D)$  e  $dD$ ; então,

$$dN_s \propto N_s(D)dD, \text{ ou } dN_s = -\lambda N_s(D)dD \rightarrow \frac{dN_s}{N_s} = -\lambda dD, \quad \text{B-2}$$

e integrando B-2 de  $(0; N_0)$  a  $(D; N_s)$  resulta,

$$N_s(D) = N_0 \cdot e^{[-\lambda \cdot D]} \quad \text{B-3}$$

Essa Eqn.B-3 contém um **conceito estatístico** importante que fica evidente quando se reescreve a Eqn.B-3 como,

$$\frac{1}{N_s} \cdot \left( \frac{dN_s}{dD} \right) = -\lambda \quad \text{B-4}$$

A derivada  $\frac{dN_s}{dD}$  é a taxa de variação de  $N_s$  por unidade de intervalo de dose, que representa uma **probabilidade** no espaço-de-fase.

Dividindo-se essa probabilidade por  $N_s$  obtem-se a **probabilidade relativa**

$\frac{1}{N_s} \cdot \left( \frac{dN_s}{dD} \right)$ , cujo valor absoluto é uma CONSTANTE ( $\lambda$ ).

### APÊNDICE C- Dados experimentais.

As curvas de crescimento das bactérias foram criadas por meio de medidas da absorbância ( $DO_{60nm}$ ) e por UFC/mL.

Tabela C1: Dados da curva de crescimento por meio da absorbância ( $DO_{60nm}$ )

Tempo (h)	<i>D.radiourans</i>		<i>E.coli</i>	
		erro <i>D.r</i>		erro <i>E.coli</i>
0	1,49467	0,11957	0,88667	0,07093
2	2,74	0,2192	1,43333	0,11467
4	6,40667	0,51253	2,29467	0,18357
6	7,7	0,616	4,27233	0,34179
8	10,55	0,844	4,76667	0,38133
10	14,85	1,188	5,54	0,4432
12	15,45	1,236	5,37333	0,42987
14	14,9	1,192	5,2	0,416
16	12,64	1,0112	4,84333	0,38747
18	11,88333	0,95067	3,44	0,2752
20	11,39	0,9112	3,24	0,2592

Tabela C2: Dados da curva de crescimento da *E.coli*, por meio da contagem direta UFC/mL

Tempo (h)horas	T1		T2		T3	
	UFC/mL	erro T1	UFC/mL	erro T2	UFC/mL	erro T3
0	1,54E+06	3,2E+05	1,72E+06	1,4E+05	2,07E+06	1,3E+05
2	1,47E+07	3,3E+06	1,37E+07	1,5E+06	1,03E+07	3,2E+06
4	3,73E+07	3,3E+06	3,33E+07	2,6E+06	3,43E+07	4,3E+06
6	4,68E+07	3,6E+06	4,80E+07	3,4E+06	5,03E+07	4,0E+06
8	5,82E+07	5,9E+06	5,87E+07	4,5E+06	5,70E+07	4,6E+06
10	5,76E+07	5,9E+06	5,67E+07	4,5E+06	5,83E+07	5,2E+06
12	5,80E+07	5,8E+06	5,73E+07	3,8E+06	5,33E+07	3,8E+06
14	4,66E+07	4,7E+06	4,77E+07	3,7E+06	4,63E+07	3,1E+06
16	4,26E+07	4,6E+06	4,33E+08	3,0E+06	3,80E+07	3,0E+06
18	3,58E+07	3,3E+06	3,27E+07	1,4E+06	4,03E+07	3,2E+06
20	2,80E+07	2,8E+00	2,77E+08	1,4E+06	3,20E+07	2,6E+06

Tabela C3: Dados da curva de crescimento da *D.radiodurans*, por meio da contagem direta UFC/mL.

Tempo h-horas	T1		T2		T3	
	UFC/mL	Erro T1	UFC/mL	Erro T2	UFC/mL	Erro T3
0	1,40E+07	1,1E+06	1,11E+07	8,9E+06	1,10E+07	8,8E+06
2	2,33E+07	1,9E+06	2,24E+07	1,8E+06	2,67E+07	2,1E+06
4	2,10E+08	1,7E+07	2,01E+08	1,6E+07	1,73E+07	1,4E+06
6	5,95E+08	4,8E+07	5,03E+08	4,0E+07	4,97E+08	4,0E+07
8	1,40E+09	1,1E+08	1,63E+09	1,3E+08	1,63E+09	1,3E+08
10	2,04E+09	1,6E+08	2,07E+09	1,7E+08	2,04E+09	1,6E+08
12	2,10E+09	1,7E+08	2,17E+09	1,7E+08	2,23E+09	1,8E+08
14	2,13E+09	1,7E+08	2,27E+09	1,8E+08	2,07E+09	1,7E+08
16	1,93E+09	1,5E+08	2,07E+09	1,7E+08	1,77E+09	1,4E+08
18	1,57E+09	1,3E+08	1,27E+09	1,0E+08	1,57E+09	1,3E+08
20	1,23E+09	9,9E+05	1,11E+09	8,9E+07	1,33E+09	1,1E+08

Tabela C4: Dados da curva de viabilidade da *E.coli* sob ação do CME 0,8T.

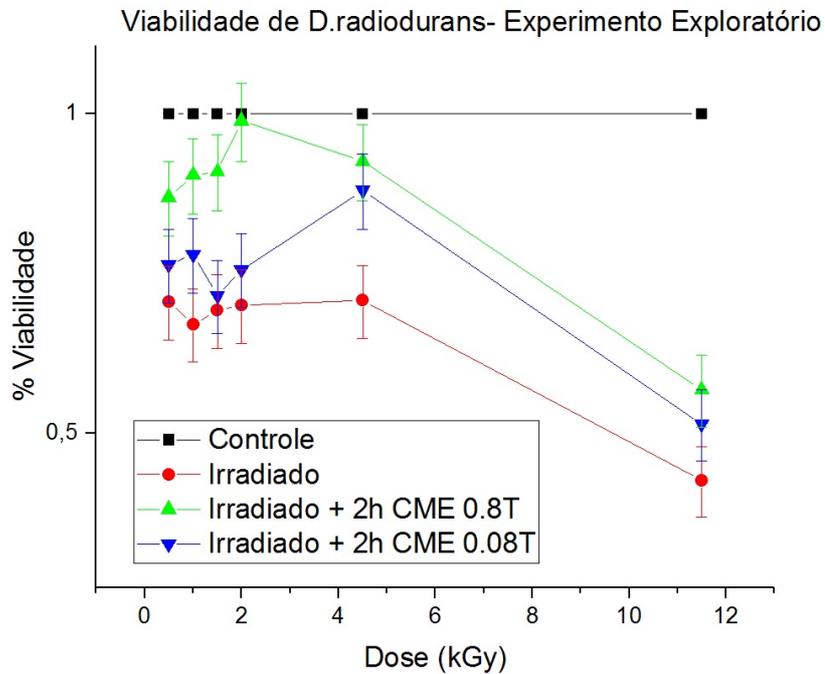
Tempo (h) horas	Teste/Controle %	erro
1	1,001581135	0,080126491
2	1,147869965	0,091829597
3	1,183760143	0,094700811
4	1,010557221	0,080844578
5	0,935277603	0,074822208
6	0,920242476	0,073619398

Tabela C5: Dados da curva de viabilidade da *E.coli* irradiada e sob ação do CME 0,8T.

Dose kGy	Controle	Irradiado	Irradiado+2h+ 0,08T		Irradiado+2h+ 0,8T		
			erro	erro	erro	erro	
0,5	1	0,45865	0,03669	0,58647	0,04692	0,87744	0,06195
1	1	0,48718	0,03897	0,54049	0,04	0,8239	0,06872
1,5	1	0,32354	0,02588	0,4281	0,03848	0,57144	0,07392

Tabela C6: Dados do teste exploratório da viabilidade da *D.radiodurans* irradiada e sob ação dos CMEs.

Dose kGy	CONTROLE	Irradiado/Controle		Irradiado+ 2h 0.8T		Irradiado+ 2h 0.08T	
		erro	erro	erro	erro	erro	erro
0.5	1	0,669	0,054	0,839	0,067	0,726	0,058
1.0	1	0,637	0,051	0,879	0,070	0,742	0,059
1.5	1	0,657	0,053	0,886	0,071	0,679	0,054
2.0	1	0,664	0,053	1,000	0,080	0,718	0,057
4.5	1	0,671	0,054	0,905	0,072	0,851	0,068
11.5	1	0,449	0,036	0,551	0,044	0,510	0,041

Gráfico C1: Gráfico da Viabilidade da *D. radiodurans* do teste exploratório.Tabela C7: Dados do teste principal da viabilidade da *D. radiodurans* irradiada e sob ação dos CMEs.

T1								
Dose kGy	controle /controle	Irradiado		Irradiado+0.8T		Irradiado +0.08T		erro
		/controle	erro	/controle	erro	/controle	erro	
0,5	1	0,812	0,069	0,948	0,081	0,838	0,071	
1	1	0,752	0,064	0,957	0,081	0,819	0,070	
1,5	1	0,674	0,057	0,973	0,083	0,824	0,070	
2	1	0,665	0,057	0,915	0,078	0,826	0,070	
4,5	1	0,614	0,052	0,907	0,077	0,760	0,065	
5	1	0,611	0,052	0,862	0,073	0,751	0,064	
5,5	1	0,558	0,047	0,854	0,073	0,757	0,064	
8	1	0,466	0,040	0,810	0,069	0,652	0,055	
10	1	0,435	0,037	0,677	0,058	0,550	0,047	
12	1	0,124	0,011	0,182	0,015	0,197	0,017	
12,5	1	0,100	0,008	0,145	0,012	0,162	0,014	

T2							
Dose	controle	Irradiado	Irradiado+0.8T		Irradiado		
kGy	/controle	/controle	erro	/controle	erro	/controle	erro
0,5	1	0,78351	0,0666	0,97938	0,08325	0,89175	0,0758
1	1	0,752	0,06392	0,936	0,07956	0,83467	0,07095
1,5	1	0,66571	0,05659	0,94524	0,08035	0,82421	0,07006
2	1	0,6473	0,05502	0,91286	0,07759	0,80913	0,06878
4,5	1	0,56889	0,04836	0,84889	0,07216	0,78667	0,06687
5	1	0,53086	0,04512	0,82305	0,06996	0,75309	0,06401
5,5	1	0,48675	0,04137	0,83113	0,07065	0,71854	0,06108
8	1	0,46311	0,03936	0,82377	0,07002	0,69262	0,05887
10	1	0,42373	0,03602	0,6368	0,05413	0,52785	0,04487
12	1	0,16964	0,01442	0,32143	0,02732	0,32589	0,0277
12,5	1	0,10877	0,00925	0,21404	0,01819	0,18947	0,01611

Tabela C8: Dados do teste validação da viabilidade da *D.radiodurans* irradiada e sob ação dos CMEs.

Dose	Controle	Gama+CM		Gama+CM		Gama+CM	
		Gama	erro	0.8T	erro	0.866T	erro
4.0	1	0,80	0,06	0,90	0,07	0,73	0,06
4.5	1	0,84	0,07	0,96	0,08	0,88	0,07
5.0	1	0,70	0,06	0,96	0,08	0,84	0,07
5.5	1	0,84	0,07	0,95	0,08	0,90	0,07
6.0	1	0,69	0,06	0,90	0,07	0,81	0,06
6.5	1	0,60	0,05	0,74	0,06	0,72	0,06
9.0	1	0,35	0,03	0,50	0,04	0,42	0,03
9.5	1	0,34	0,03	0,48	0,04	0,43	0,03
12.0	1	0,02	0,00	0,02	0,00	0,04	0,00
12.5	1	0	0	0	0	0	0
13.0	1	0	0	0	0	0	0