

# Interferência de ondas curtas pulsadas na adesividade e na fagocitose de macrófagos em ratos com desnutrição neonatal

## *Interference of pulse short waves on macrophage adhesion and phagocytosis in rats with neonatal malnutrition*

Eduardo J. N. Montenegro<sup>1</sup>, Paula Roberta T. Hirakawa<sup>2</sup>, Maria D. Costa<sup>3</sup>, Márcio B. Pedroza<sup>4</sup>, Ana Carine M. Gouveia<sup>5</sup>, Raul M. de Castro<sup>6</sup>, Célia M. M. B. de Castro<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Fisioterapeuta; Prof. do Depto. de Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

<sup>2,4,5</sup> Alunos do Curso de Fisioterapia da UFPE

<sup>3</sup> Aluna do Curso de Medicina da UFPE

<sup>6</sup> Médico; Prof. do Depto. de Nutrição da UFPE

<sup>7</sup> Médica; Profa. do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) do Depto. de Medicina Tropical da UFPE

ENDEREÇO PARA  
CORRESPONDÊNCIA  
Célia M. M. B. de Castro  
Hospital das Clínicas  
bl. A  
Av. Moraes Rego s/n  
Cidade Universitária  
53670-910 Recife PE  
e-mail:  
ccastro@lika.ufpe.br

ACEITO PARA PUBLICAÇÃO  
mar. 2005

**RESUMO:** Tendo em vista a relação estabelecida entre desnutrição neonatal e atividade celular ligada ao sistema imune, macrófagos peritoneais de ratos Wistar machos, desnutridos e recuperados, foram expostos à diatermia de ondas curtas pulsadas (DOCP) e a campo magnético (CM) alternado em frequência ultrabaixa para verificar *in vitro* as possíveis alterações no índice de aderência e na atividade fagocítica. Foram submetidos a DOCP modulada em 30 Hz, 50 Hz e 430 Hz na técnica de Schliephake e na técnica convencional em paralelo, e a um CM de 60 Hz. Foi constatado aumento no índice de aderência celular nos grupos experimentais de 30 Hz e 50 Hz na técnica de Schliephake e ao CM de 60 Hz em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). A atividade fagocítica diminuiu apenas nos grupos de 30 Hz e 50 Hz na técnica de Schliephake e ao CM de 60 Hz em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Assim, a DOCP de 30 Hz e 50 Hz na técnica de Schliephake e o CM aumentaram o índice de aderência e diminuíram a atividade fagocítica, o que pode ter aplicações em processos traumáticos agudos. Como macrófagos de animais desnutridos e recuperados mostraram responder a essas irradiações, e como estas são largamente utilizadas em fisioterapia, esses achados auxiliarão na escolha da modulação da DOCP durante o procedimento terapêutico, particularmente em casos que tenham sofrido desnutrição pregressa.

**DESCRIPTORES:** Desnutrição; Doenças imunológicas; Fagocitose; Ondas de rádio; Eletromagnetismo; Fatores ativadores de macrófagos

**ABSTRACT:** In view of the established relationships between neonatal malnutrition and the immune system, peritoneal macrophages of male Wistar rats were exposed to diathermic pulsed short waves (DPSW) and to alternated magnetic field on extreme low frequency, in order to verify *in vitro* adhesion index and phagocytic activity. The rats were submitted to malnutrition during the nursing period and to a recovery diet after weaning. The extracted peritoneal macrophages were exposed to DPSW modulated at 30 Hz, 50 Hz and 430 Hz by using the Schliephake and conventional techniques in parallel, and to a magnetic field of 60 Hz. Results show increased adhesion index only with the 30 Hz and 50 Hz experimental groups using Schliephake technique and CM 60 Hz; phagocytic activity was reduced with 30 Hz and 50 Hz using Schliephake technique and CM 60 Hz, as compared to the control group ( $p < 0,05$ ). Since macrophages of malnourished and recovered animals responded to such irradiations, and since these are largely used in physical therapy, present results could be used to choose correct DPSW modulation in therapeutic process, particularly in cases who have previously suffered malnutrition.

**KEY WORDS:** Malnutrition; Immunologic diseases; Phagocytosis; Radio waves; Electromagnetics; Macrophage-activating factors

## INTRODUÇÃO

A desnutrição é um dos problemas mais importantes de saúde pública no mundo. Estima-se que cerca de metade da população mundial sofra de algum tipo de desnutrição<sup>1</sup>. A prevalência de moléstia infecto-contagiosa em áreas onde a fome é endêmica torna a situação mais agravante, uma vez que a resistência a infecções nessas populações apresenta-se reduzida. Como consequência, a severidade dos processos infecciosos e a mortalidade na população malnutrida são maiores do que na população hígida<sup>2</sup>.

Dados epidemiológicos e clínicos demonstram que a deficiência nutricional altera o comportamento do sistema imune<sup>3</sup>, promovendo enfraquecimento na imunidade mediada pelas células, na função fagocítica, na concentração de anticorpos nos líquidos orgânicos, na produção de citocinas; altera-se também o sistema complemento, aumentando com isso o risco de infecção<sup>4</sup>.

A deficiência de nutrientes simples, como zinco, selênio, ferro, cobre, vitaminas A, E, C, B-6 e ácido fólico, resulta em alteração da resposta imune, mesmo quando o estado de deficiência é relativamente pequeno<sup>5</sup>. Esses nutrientes estão envolvidos nos efeitos regulatórios da função imune adaptativa, principalmente quando mediados por citocinas<sup>6</sup>. Há indícios de que a desnutrição durante o período crítico de desenvolvimento do encéfalo pode

acarretar danos no desenvolvimento e funcionamento das funções do sistema imune<sup>7</sup>. As interações entre o encéfalo, a hipófise e o timo em estágios precoces de desenvolvimento têm sido estudadas e os resultados demonstram uma relação clara entre o encéfalo, a hipófise e o timo na fase embrionária, ou seja, entre o sistema nervoso, o sistema endócrino e o sistema imune<sup>8</sup>. A maioria dos estudos a respeito é realizada em animais desnutridos, mas que não foram recuperados totalmente ou parcialmente da desnutrição, deixando com isso lacunas no esclarecimento do comportamento do sistema imune após recuperação total ou parcial do quadro de desnutrição promovido durante esse período.

Progressos recentes em imunologia enfatizam o papel dos macrófagos no sistema imune, como reguladores da homeostase ou como células efetoras nas infecções, tumores e ferimentos<sup>9</sup>. A desnutrição neonatal acarreta no rato adulto seqüela duradoura na atividade funcional do macrófago alveolar<sup>10</sup>. A desnutrição, mesmo após recuperação nutricional, parece deixar seqüelas irreversíveis sobre os elementos do sistema imune, a exemplo dos macrófagos<sup>10</sup>.

Os macrófagos são influenciados também pela ação dos campos eletromagnéticos, alterando-se sua capacidade de resposta diante de antígenos<sup>11</sup>. Na Fisioterapia, tem aumentado o emprego das irradiações eletromagnéticas em diversos tipos de tratamento. Nos

hospitais públicos atende-se diariamente, no setor de Fisioterapia, um grande número de pacientes que utilizam esse recurso. A pergunta que surge então na atividade da clínica diária é: os "renutridos" respondem às terapêuticas vigentes, que em geral não levam em conta eventual desnutrição pregressa?

O objetivo deste estudo é investigar a influência da diatermia de ondas curtas pulsadas (DOCP) e do campo magnético (CM) de frequência ultrabaixa sobre a atividade fagocítica e o índice de aderência (mecanismos básicos das células fagocíticas) de macrófagos peritoniais de ratos desnutridos durante o período de desenvolvimento do sistema imune e posteriormente submetidos a recuperação nutricional.

## METODOLOGIA

### Obtenção das células

Foram utilizados 24 ratos machos Wistar com idade entre 60 e 90 dias (nessa idade os animais são considerados adultos), desnutridos, aleitados por mães submetidas a dieta nutricional deficiente\* durante o período de lactação, aproximadamente 24 dias pós-natal. Após o desmame os animais foram mantidos no biotério sob temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo a dieta padrão do biotério (LABINA) e água *ad libitum* até o sacrifício. Quatro dias antes do experimento, os animais foram es-

\* A dieta insuficiente das mães foi calculada com base na Dieta Básica Regional (DBR), modelo dietético da alimentação consumida por comunidades do Nordeste do Brasil, que comprovadamente causa desnutrição (Tabela 1).

**Tabela 1** Composição centesimal da DBR

| Ingredientes                    | g %    | Proteína | Carboidratos | Lipídeos | Cinzas | Fibras | Kcal   |
|---------------------------------|--------|----------|--------------|----------|--------|--------|--------|
| Feijão cozido e seco            | 18,34  | 3,99     | 10,66        | 0,24     | 0,57   | 1,09   | 60,76  |
| Farinha de mandioca             | 64,81  | 0,84     | 48,59        | 0,12     | 0,43   | 5,64   | 198,8  |
| Carne seca salgada              | 3,74   | 2,74     | -            | 0,06     | 0,06   | -      | 11,50  |
| Gordura da carne salgada e seca | 0,35   | -        | -            | 0,35     | -      | -      | 3,15   |
| Batata doce                     | 12,76  | 0,30     | 9,99         | 0,03     | 0,20   | 0,48   | 41,43  |
| Total                           | 100,00 | 7,87     | 69,24        | 0,80     | 1,26   | 7,21   | 315,64 |

Adaptado de Teodósio et al.<sup>12</sup>

timulados com injeção intraperitoneal de 5 ml de caseinato de sódio a 6% estéril (substância indutora de diferenciação de monócitos em macrófagos).

Após pesagem e sedação, os animais foram sacrificados por secção medular para realização do lavado peritoneal (método utilizado pelo laboratório e aceito pelo Comitê de Ética). Fez-se a limpeza da área com álcool iodado, incisão da pele na porção mediana do abdome e injeção de 10 ml de solução salina estéril. Após massagem digital, realizou-se a incisão na membrana peritoneal e aspiração de todo o líquido. Todo volume do exudato recuperado foi quantificado e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. As células foram ressuspendidas em 2 ml de NaCl 0,2% estéril para lisar as hemácias, por dois minutos, e o volume final do lavado recuperado com NaCl 0,9% estéril para nova centrifugação (10 minutos/1500 rpm). As células foram ressuspendidas em meio de cultura RPMI 1640 completo (penicilina 100U/ml e estreptomicina 100µg/ml - Sigma) com o volume equivalente ao volume final do lavado, para contagem. Para cada animal obteve-se em média 40 milhões de macrófagos, dos quais 95% eram células morfológicamente aceitas pelas técnicas de coloração de Giemsa, no qual se utiliza um reagente no 1 que contém eosina e azul de metileno e o reagente no 2 contendo azul II (80mg/dl) e eosinato de azul II (100 mg/dl). A viabilidade testada foi sempre maior que 95% pela exclusão com azul tripan.

### Equipamentos e irradiação das células

Para obtenção das culturas de macrófagos irradiados, parte da suspensão das células provenientes de cada animal (em triplicata), após o lavado peritoneal, foi submetida a um campo magnético senoidal de frequência ultrabaixa (60 Hz) com densidade de campo magnético de 10µT

(microTesla) e a um emissor de DOCP (Diatermax LM 9006 da KLD) com onda portadora senoidal modulada em frequência ultrabaixa em *bursts* (pulsos), com os parâmetros de exposição que constam do Quadro 1, com emissão de 40% de sua potência total, como indicado pelo fabricante<sup>13</sup> utilizando a técnica de Schliephake (que consiste em um distanciamento dos eletrodos da área tratada de 10 a 20 cm) e a técnica convencional em paralelo (que consiste em um distanciamento dos eletrodos da área tratada de 2 a 4 cm). Note-se que os campos elétricos gerados foram dependentes da potência emitida, da distância da fonte emissora (eletrodos) e da modulação da frequência. A densidade de potência do campo foi medida fora do meio de cultura RPMI 1640 onde se encontra a amostra. A condutividade do meio RPMI-1640 é de 7,64 mSiemens (~164 ohm) e a resistência do ar é aproximadamente 377 ohm. Com esses valores verificou-se que a resistividade do meio não interfere na potência do campo medido.

As amostras irradiadas foram colocadas a 15 cm de distância dos eletrodos da DOCP na técnica de Schliephake (valor médio das distâncias de 10 a 20 cm) e na técnica convencional em paralelo foram colocadas a 3 cm de distância do eletrodo (valor médio das distâncias de 2 a 4 cm) que, nesse local, gerou uma ten-

são de campo elétrico alternado. A tensão do campo elétrico gerado pela DOCP foi medida por osciloscópio digital (marca Hewlett Packard 54600B) acoplado a uma bobina indutora de campo eletromagnético proveniente de um multímetro (*Logger Multimeter*) no local onde o tubo de vidro estava com a amostra. Esse procedimento teve como objetivo garantir que qualquer elevação em termos de energia fornecida ao sistema (células) fosse exclusivamente dependente da frequência e não do aumento de tensão. A distância entre os eletrodos foi de 30 cm. As amostras foram colocadas em estante de isopor (poliestireno expandido, 2% de poliestireno e 98% de ar) durante a exposição. Os eletrodos emissores da DOCP também foram fixados em suportes de isopor. As amostras que serviram de controle foram colocadas em ambiente seguro, afastado da emissão do campo. Foi efetuada no ambiente, antes da exposição, uma varredura para mapear qualquer campo que pudesse interferir com o campo experimental. O equipamento utilizado foi o Trifield Natural EM Meter e o referido osciloscópio digital. Não foi identificado qualquer campo com intensidade suficiente para interferir no experimento (o campo elétrico alternado ambiental foi de 47,8 mV). A densidade da potência do campo foi medida pelo equipamento Anritsu Power Meter ML 4803A.

**Quadro 1** Esquema de irradiação para DOCP com 40% de potência de sua emissão total

| Tratamento   | Tempo<br>(minutos) | Frequência<br>(Hz) | Vp-p  | D.P.C                   |
|--------------|--------------------|--------------------|-------|-------------------------|
| Controle     | 0                  | 0                  | 0     | 0                       |
| Schliephake  | 15                 | 30                 | 7,8 V | 0,381µW/cm <sup>2</sup> |
| Schliephake  | 15                 | 50                 | 7,8 V | 0,65µW/cm <sup>2</sup>  |
| Schliephake  | 15                 | 430                | 7,8 V | 6,35µW/cm <sup>2</sup>  |
| Convencional | 15                 | 30                 | 32 V  | 6,36µW/cm <sup>2</sup>  |
| Convencional | 15                 | 50                 | 32 V  | 11µW/cm <sup>2</sup>    |
| Convencional | 15                 | 430                | 32 V  | 91,37µW/cm <sup>2</sup> |

Hertz (Hz): número de ciclos por segundo; Vp-p: Voltagem pico a pico da onda eletromagnética (*burst*); D.P.C: Densidade de potência do campo em microWatts/centímetro quadrado

Para obtenção dos macrófagos irradiados com o campo magnético senoidal de frequência ultrabaixa (60 Hz) com densidade de fluxo magnético de 10  $\mu$ T, foi utilizado um autotransformador ATS Line de 500 VA. As amostras foram colocadas em uma estante de Poliestireno expandido a uma distância de 11,5 cm em sentido vertical da fonte emissora do campo por um período de 1 hora. O campo magnético foi mensurado através do equipamento Trifield Broadband Meter. O mesmo procedimento de segurança utilizado para a DOCP foi tomado em relação à exposição à baixa frequência.

### Índice de aderência

Para o experimento, macrófagos provenientes do lavado peritoneal irradiados ou não e divididos em triplicata foram transferidos para poços de 35 mm de diâmetro em placas de culturas com 6 poços cada, em uma densidade de 2 X 10<sup>6</sup> células/ml com total de 2 ml por poço. As placas foram mantidas em estufa a 37°C, sob atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 60 minutos. Em seguida, alíquotas de 10  $\mu$ l da amostra foram retiradas para contagem das células não-aderidas, em diluição de 1/10 em azul tripan na câmara de Neubauer.

O cálculo do índice de aderência foi realizado empregando-se a fórmula de Segura et al.<sup>14</sup>:

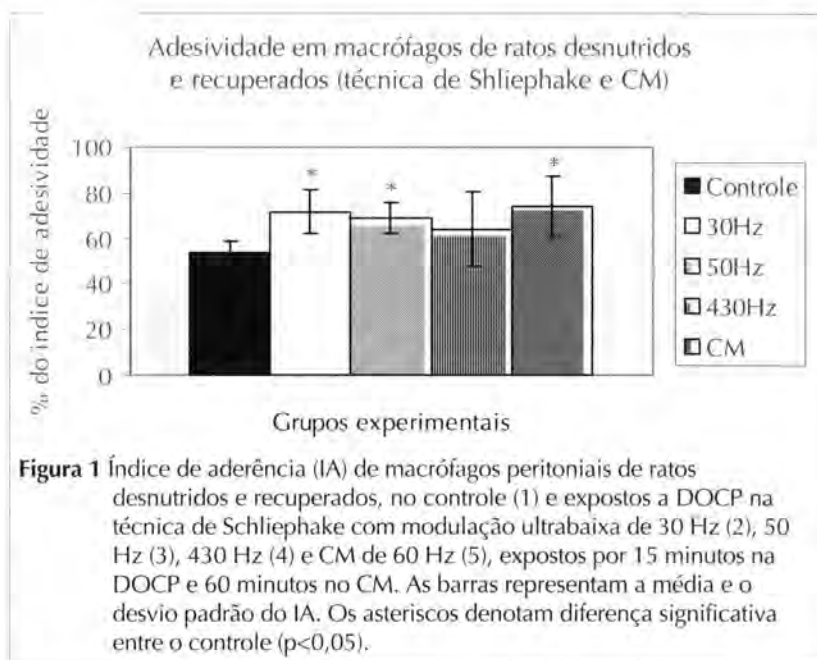
$$IA = 100 - \frac{\text{células não aderidas} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ inicial de células/ml}}$$

### Atividade fagocítica

Macrófagos recuperados do lavado peritoneal foram divididos em triplicata, como descrito acima. Para se avaliar a taxa de fagocitose, foram utilizados fungos *Saccharomyces sp.* Os fungos foram lavados três vezes com Solução Salina Balanceada de Hanks' (HBSS). Em seguida, 10<sup>8</sup> fungos/ml foram misturados em suspensão, contendo 10<sup>6</sup> macrófagos/ml de meio RPMI 1640.

As células (macrófagos e fungos) irradiadas ou não foram distribuídas em lâmina para microscopia óptica e incubadas a 37°C, em atmosfera úmida, por um período de uma hora. Após esse período as lâminas foram lavadas com HBSS, secadas à temperatura ambiente e coradas com Diff-Quik set (Baxter Dade, Düdingen, Switzerland). A leitura foi feita em microscópio óptico, com objetiva de 100X sob imersão. A taxa de fagocitose foi obtida, em percentual, pela contagem de macrófagos que fagocitaram o fungo, em um total de 200 células.

ultrabaixa de 30 Hz (2), 50 Hz (3), 430 Hz (4) e campo magnético de 60 Hz (5). Aumento significativo no índice de aderência foi detectado nos grupos experimentais na técnica de Schliephake de 30 Hz e 50 Hz e no CM de 60 Hz após um período de exposição de 15 minutos para a DOCP e 60 minutos para o CM. O grupo experimental de 430 Hz não apresentou aumento no índice de aderência. A média e o desvio padrão do IA no controle foi de 54,13  $\pm$  4,86 em relação a 71,7  $\pm$  9,54 para DOCP de 30 Hz, 68,86  $\pm$  6,64 para DOCP de 50 Hz, 64,28



**Figura 1** Índice de aderência (IA) de macrófagos peritoneais de ratos desnutridos e recuperados, no controle (1) e expostos a DOCP na técnica de Schliephake com modulação ultrabaixa de 30 Hz (2), 50 Hz (3), 430 Hz (4) e CM de 60 Hz (5), expostos por 15 minutos na DOCP e 60 minutos no CM. As barras representam a média e o desvio padrão do IA. Os asteriscos denotam diferença significativa entre o controle ( $p < 0,05$ ).

### Análise estatística

Para análise comparativa entre o grupo controle e o grupo experimental, tanto para a fagocitose quanto para o índice de aderência, foi utilizado o Teste-t de Student com nível de significância de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

O índice de aderência (IA) foi avaliado pela contagem de células que aderiram, ou não, à superfície dos poços nas placas de cultura. Apresentam-se na Figura 1 o IA dos macrófagos controle (1) e expostos a DOCP na técnica de Schliephake com modulação

$\pm$  16,09 para DOCP de 430 Hz e 73,86  $\pm$  13,56 para CM de 60 Hz ( $p < 0,05$ ).

A atividade fagocítica foi medida a partir do contato de macrófagos peritoneais de ratos com *Saccharomyces sp* na presença ou na ausência da DOCP na técnica de Schliephake com modulação ultrabaixa de 30 Hz, 50 Hz, 430 Hz e CM de 60 Hz (Figura 2). Ocorreu diminuição em termos estatísticos na atividade fagocítica nos grupos da DOCP em 30 Hz e 50 Hz e no CM de 60 Hz, mas não ocorreu diminuição no grupo de 430 Hz após um período de exposição de 15 minutos para a DOCP. A mé-

dia e o desvio padrão da atividade fagocítica no controle foi de  $22,75 \pm 2,18$  em relação a  $11,83 \pm 2,16$  para DOCP de 30 Hz,  $11,75 \pm 2,40$  para DOCP de 50 Hz,  $21,83 \pm 0,98$  para DOCP de 430 Hz e  $9,75 \pm 1,4$  para CM de 60 Hz ( $p < 0,05$ ).

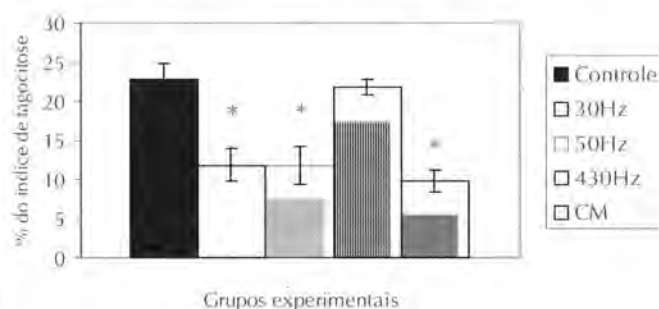
São apresentados na Figura 3 o IA dos macrófagos controle (1) e expostos a DOCP na técnica convencional em paralelo com modulação ultrabaixa de 30 Hz (2), 50 Hz (3) e 430 Hz (4). Nenhum efeito significativo foi observado no índice de aderência nos grupos experimentais de 30Hz, 50 Hz e 430 Hz após um período de exposição de 15 minutos. A média e o desvio padrão do IA no controle foi de  $52,14 \pm 3,93$  em relação a  $56,07 \pm 10,59$  para DOCP de 30 Hz,  $57,85 \pm 9,06$  para DOCP de 50 Hz,  $56,42 \pm 6,26$  para DOCP de 430 Hz ( $p > 0,05$ ).

Tampouco qualquer efeito significativo foi observado na atividade fagocítica nos grupos da DOCP na técnica convencional em paralelo com modulação ultrabaixa de 30 Hz, 50 Hz e 430 Hz, após um período de exposição de 15 minutos (Fig.4). A média e o desvio padrão da atividade fagocítica no controle foi de  $22,57 \pm 3,59$  em relação a  $20,85 \pm 4,59$  para DOCP de 30 Hz,  $22,28 \pm 3,19$  para DOCP de 50 Hz,  $22,71 \pm 4,99$  para DOCP de 430 Hz ( $p > 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

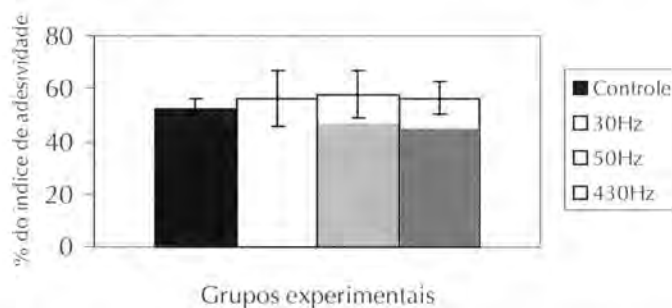
Neste estudo a adesividade celular de macrófagos peritoneais de ratos foi avaliada por meio do índice de aderência (IA), após a exposição das células dos animais desnutridos e recuperados da desnutrição aos campos de DOCP e CM de 60 Hz. Foi observado aumento da adesividade celular após um tempo de exposição de 15 minutos para as frequências moduladas em ultrabaixa frequência de 30 Hz e 50 Hz na técnica de Schliephake e de 60 minutos para

Fagocitose em macrófagos de ratos desnutridos e recuperados (técnica de Schliephake e CM)



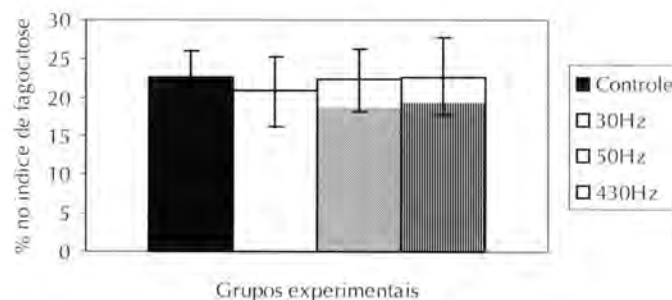
**Figura 2** Atividade fagocítica de macrófagos peritoneais de ratos desnutridos e recuperados, no controle (1), expostos a DOCP na técnica de Schliephake com modulação ultrabaixa de 30 Hz (2), 50 Hz (3), 430 Hz (4) e CM de 60 Hz (5) expostos por 15 minutos na DOCP e 60 minutos no CM. As barras representam a média e o desvio padrão da atividade fagocítica. Os asteriscos denotam diferença significativa entre o controle ( $p < 0,05$ ).

Adesividade em macrófagos de ratos desnutridos e recuperados (técnica convencional e CM)



**Figura 3** Índice de aderência (IA) de macrófagos peritoneais de ratos desnutridos e recuperados, no controle (1) e expostos a DOCP na técnica convencional em paralelo com modulação ultrabaixa de 30 Hz (2), 50 Hz (3), 430 Hz (4) expostos por 15 minutos. As barras representam a média e o desvio padrão do IA ( $p > 0,05$ ).

Fagocitose em macrófagos de ratos desnutridos e recuperados (Técnica convencional e CM)



**Figura 4** Atividade fagocítica de macrófagos peritoneais de ratos desnutridos e recuperados, no controle (1), expostos a DOCP na técnica convencional em paralelo com modulação ultrabaixa de 30 Hz (2), 50 Hz (3), 430 Hz (4) expostos por 15 minutos. As barras representam a média e o desvio padrão da atividade fagocítica ( $p > 0,05$ ).

os CM de 60 Hz, cujos parâmetros são utilizados na prática fisioterápica e encontrados em ambientes de trabalho respectivamente. Os campos de DOCP modulados em frequência ultrabaixa de 30 Hz, 50 Hz e 430 Hz na técnica convencional em paralelo e de 430 Hz na técnica de Schliephake não alteraram a adesividade celular.

A desnutrição energética proteica modifica tanto a resistência específica como a não-específica do organismo para agentes infecciosos<sup>1</sup>.

Os macrófagos são reconhecidos por sua atuação na defesa contra a invasão do organismo por antígenos estranhos. Essas células podem migrar para o interstício do foco de reação após aderir às células endoteliais<sup>14</sup>. A desnutrição energética proteica altera esse mecanismo reduzindo a expressão de moléculas de adesão e a ativação de macrófagos<sup>14-16</sup>, podendo assim interferir de forma negativa no mecanismo de sinalização celular dos macrófagos, como o fluxo de cálcio e a fosforilação das proteínas quinases<sup>16</sup>. Além disso, a atividade da cadeia transportadora de elétrons é drasticamente reduzida na desnutrição, ocorrendo menor produção de ATP para as células<sup>16</sup>. O ATP tem como principal função fornecer energia para o equilíbrio entre o processo de fosforilação e desfosforilação de proteína específica na sinalização celular<sup>17</sup>.

A interação adesiva é mediada por moléculas proteicas transmembranares dependentes ou não dos íons cálcio. As moléculas adesivas dependentes de cálcio apresentam fortalecimento na adesão quando em presença desse íon<sup>18</sup>. Moléculas independentes de cálcio são eletronegativas (ácido siálico) e quanto maior for essa eletronegatividade, menor será a força de adesão. Caso essas moléculas se tornem menos eletronegativas, o processo de adesão é fortalecido<sup>19</sup>. Estudos da dinâmica de adesão celular demonstraram que esse tipo de

interação responde pelas leis que regem as atividades enzimáticas tendo sua velocidade diminuída na presença de baixas temperaturas<sup>20</sup>.

Os campos eletromagnéticos alteram não só a concentração do cálcio intracelular como também interferem na atividade enzimática das células imunes<sup>21</sup>. Esse efeito pode interferir na sinalização e no comportamento celular, mecanismo ainda não totalmente compreendido<sup>21-23</sup>.

Pelos resultados deste trabalho, sugere-se que a DOCP com a potência e a frequência modulada de 30 Hz e 50 Hz na técnica de Schliephake, bem como o CM de 60 Hz entraram em ressonância com o sistema (células), deflagrando aumento da adesividade celular e interferindo no comportamento do cálcio. Neste trabalho os animais foram submetidos a uma desnutrição severa durante o período de formação do sistema imune e foram recuperados após essa fase. Apesar de a literatura indicar que a desnutrição energética proteica promove eventos como desarranjo na expressão de moléculas de adesão<sup>14-16</sup>, redução da ativação de macrófagos, interferência na sinalização intracelular dos macrófagos<sup>17</sup>, no presente estudo os campos eletromagnéticos aumentaram o índice de aderência que, em parte, está diretamente relacionado com os íons cálcio, fortalecendo esse fenômeno celular. O mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não é conhecido.

A adesividade celular não sofreu influência da DOCP na técnica convencional em paralelo na modulação de frequências ultrabaixas de 30 Hz, 50 Hz e 430 Hz, como também não sofreu influência na técnica de Schliephake na frequência ultrabaixa de 430 Hz. Isso sugere que a potência de densidade do campo, que em parte foi dependente da frequência modulada, não se encontra na faixa de janela específica do sistema celular. Deve ser observado que a DOCP de 430 Hz na técnica

de Schliephake gerou uma densidade de potência no local das amostras de  $6,35 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ , coincidente com a potência gerada na DOCP de 30 Hz com a técnica convencional em paralelo ( $6,36 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ). Neste trabalho, o que podemos observar é que o campo eletromagnético com os parâmetros utilizados não foi eficaz em alterar o comportamento das moléculas de adesão celular.

O processo de ativação celular promovido puramente pelos campos não-ionizantes é muito discutido. Alguns resultados demonstram que esse processo só é possível caso a célula já tenha sido pré-estimulada com alguma substância<sup>24</sup>. Resultados recentes apresentam evidências de que esses campos podem ativar a célula de forma direta<sup>25,26</sup> mas, como já comentado, o mecanismo exato dessa ativação permanece desconhecido<sup>20,23</sup>. Hipóteses existem; uma delas é que a cadeia de sinalização que envolve o inositol trifosfato (IP3) é potencializada pelos campos não-ionizantes. O IP3 abre os canais de cálcio no retículo endoplasmático, elevando a concentração desse íon no interior da célula e deflagrando assim todos os processos de sinalização celular promovidos pelo cálcio<sup>27</sup>. No momento em que o macrófago entrou em contato com o plástico da placa, a exposição prévia aos campos agiu como um co-estímulo, aumentando a afinidade pela interferência nos íons cálcio.

A provável aplicação clínica deste conhecimento é que a DOCP pode ser utilizada em processo inflamatório onde células necessitam de adesão para migrar ao foco inflamatório (lesões traumáticas agudas e crônicas). Já foi demonstrado clinicamente em idosos, que apresentam naturalmente aumento da adesão de macrófagos, que esse fenômeno, quando instalado cronicamente, não é benéfico para o organismo, pois está ligado à formação de aterosclerose<sup>28</sup>. A utilização desse tipo de irradiação (DOCP) deve

ser por tempo relativamente curto e a análise foi efetuada após uma hora da irradiação *in vitro*, não se sabendo então como esse processo se comporta após tempo mais longo. Com o CM de 60 Hz, o período de exposição de 60 minutos foi suficiente para deflagrar o mesmo processo. A preocupação inicial com esse tipo de irradiação é que ela é encontrada em ambientes de trabalho industrial que utilizam equipamentos elétricos, onde pessoas permanecem por períodos de até oito horas diárias<sup>29</sup>.

A atividade fagocítica demonstrou uma redução após a exposição a DOCP modulada em frequência ultrabaixa na técnica de Schliephake de 30 Hz e 50 Hz e ao CM de 60 Hz. A ativação fisiológica do macrófago está associada à fagocitose e aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio. Caso contrário, se a atividade fagocítica é reduzida, a formação de espécies reativas de oxigênio decai<sup>22</sup>. A ativação é deflagrada por estímulos na membrana celular, que é transduzida para o interior citoplasmático pelas cascatas de sinalização celular<sup>30</sup>. No caso particular deste estudo, foi utilizada a levedura *Saccharomyces sp* para ativar a resposta fagocitária dos macrófagos.

Macrófagos obtidos de animais com deficiência energética proteica, de vitamina D3 e A apresentaram baixa atividade fagocítica e antitumoral<sup>31-33</sup>. A associação entre deficiência nutricional e aumento na susceptibilidade às doenças infecciosas já é bem conhecida<sup>34</sup>. Uma diminuição na atividade fagocítica com aumento nos níveis de cálcio intracelular

foi conseguida com campo magnético contínuo<sup>35</sup> e com microondas de baixíssima intensidade<sup>36</sup>.

As variações nos níveis do íon cálcio intracelular promovem alterações tanto estimulatórias como inibitórias nas células do sistema imune<sup>37</sup>. Os dados experimentais levam a crer que campos eletromagnéticos aumentam a permeabilidade da membrana citoplasmática para íons cálcio pelos canais de cálcio, podendo também inibir o efluxo desse íon para o exterior da célula. A reserva de cálcio no retículo endoplasmático é liberada por mensageiros celulares e a própria captação para o interior do retículo endoplasmático pode ser alterada pelos campos eletromagnéticos, com isso mantendo as concentrações do íon elevadas no citosol<sup>38</sup>.

Cátions divalentes como o cálcio foram identificados como dos fatores mais importantes para influenciar a fagocitose. O aumento intracelular está associado com a diminuição da fagocitose de partículas estranhas<sup>39,40</sup>.

A dificuldade para entender a resposta celular aos campos não-ionizantes é que ele se apresenta de forma não-linear e não-limiar, ou seja, pequenas intensidades podem apresentar grandes efeitos, altas intensidades podem passar despercebidas pela célula<sup>35</sup>. A adesividade celular e a atividade fagocítica dos macrófagos dos animais desnutridos e recuperados, estudados neste trabalho, foram alteradas com campos que apresentaram menor densidade de potência de energia (30 Hz e 50 Hz na técnica de Schliephake e CM de 60 Hz) em relação a cam-

pos com maiores densidades (430 Hz na técnica de Schliephake e 30 Hz, 50 Hz e 430 Hz na técnica convencional em paralelo).

Os macrófagos residentes dos tecidos conjuntivos representam a primeira linha de defesa contra processos infecciosos<sup>9</sup>. Caso o sistema tenha sua atividade diminuída, agentes externos e internos podem proliferar-se com maior facilidade, pois encontrariam pouca resistência a seu avanço; isso traz preocupação quanto à exposição do terapeuta e do trabalhador a campos dessa ordem, por tempo indeterminado. Pacientes que sofreram desnutrição durante a fase crítica de desenvolvimento do sistema imune poderão naturalmente apresentar diminuição na atividade fagocítica, que poderá ser potencializada pela aplicação da DOCP ou da exposição ao CM de 60 Hz.

## CONCLUSÃO

A DOCP modulada em ultrabaixa frequência de 430 Hz na técnica de Schliephake e de 30 Hz, 50 Hz e 430 Hz na técnica convencional em paralelo não interfere no índice de aderência e na atividade fagocítica dos ratos desnutridos e recuperados. A DOCP modulada em ultrabaixa frequência de 30 Hz e 50 Hz na técnica de Schliephake e o CM de 60 Hz aumentam o índice de aderência (IA) e reduzem a atividade fagocítica dos macrófagos dos ratos desnutridos e recuperados, podendo ter aplicações práticas em processos traumáticos agudos que necessitem de interferência na adesividade celular e na atividade fagocítica.

## REFERÊNCIAS

- 1 Keusch GT. The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. *J Nutri.* 2003;133:S336-40.
- 2 Moore SE, Goldblatt D, Bates CJ, Prentice AM. Impact of nutritional status on antibody responses to different vaccines in undernourished Gambian children. *Acta Paediatr.* 2003;92:170-6.
- 3 Chandra RK. Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:14304-7.
- 4 Chandra RK. Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur J Clin Nutr.* 2002;3:S73-6.
- 5 Chandra RK. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr.* 1997;66:S460-3.
- 6 Cunningham RS, Ahrn S, Abuav NR, Dnistrian A. Development of immunocompetence: role of micronutrients and microorganisms. *Nutr Ver.* 2002;60:S68-72.
- 7 Homo DF, Dardene M. The neuroendocrine-immune axis. *Springer Semin Immunopathol.* 1993;14:221-38.
- 8 Bockman DE, Kirby ML. Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest. *Science.* 1984;233:498-500.
- 9 Celada A, Nathan C. Macrophage activation revisited. *Immunol Today.* 1994;15:100-2.
- 10 De Castro CMMB, De Castro RM, De Medeiros AF, Santos Q, Silva WTFE. Effect of stress on the production of O-2 in alveolar macrophages. *J Neuroimmunol.* 2000;108:68-72.
- 11 Jirillo E, Altamura M, Casale D, Pepe T, Venecia FP, Soleo L, et al. Effects of function of human lymphocytes exposed to electromagnetic fields with a frequency from 1500 to 2000M Hz. *G Ital Med Lav Ergon.* 2003;25:369-70.
- 12 Teodósio NR, Lago ES, Romani SAM, Guedes RCA. A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latinoam Nutr.* 1990;40(4):533-47.
- 13 KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda. Manual de operação LM 9006. Diatermax. 1-10.
- 14 Segura JJ, Jiménez-Rubio A. Effect of eugenol on macrophage adhesion in vitro to plastic surfaces. *Endod Dent Traumatol.* 1998;14:72-4.
- 15 Fukatsu K, Hiraide H. Role of polymorphonuclear neutrophils and macrophages in prevention of postoperative infections. *Nippon Geka Gakkai Zasshi.* 2003;104:506-10.
- 16 Machaiah JP. Effects of protein restriction on functional properties of rat peritoneal macrophages. *Indian J Exp Biol.* 1994;29:468-73.
- 17 McCarter MM., Naama HA, Shou J, Kwi LX, Evoy DA, Calvano SE, et al. Altered macrophage intracellular signaling induced by protein calorie malnutrition. *Cell Immunol.* 1998;183:131-6.
- 18 Briet F, Twomey C, Jeejeebhoy KN. Effect of malnutrition and short-term refeeding mononuclear cell mitochondrial complex activity in humans. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:1304-11.
- 19 Bereiter-Hahn J. Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol.* 1990;122:1-63.
- 20 Coccia EM, Del Russo N, Stellacci E, Testa U, Marziali G, Battistini A. STAT1 activation during monocyte to macrophage maturation: role of adhesion molecules. *Intern Immunol.* 1999;11(7):1075-83.
- 21 Anderson JM, Balda MS, Fanning AS. The structure and regulation of tight junctions. *Curr Opin Cell.* 1993;5:772-8.
- 22 Ueda MJ, Ito T, Ohnishi S, Okada TS. Phagocytosis by macrophages I: kinetics of adhesion between particles and phagocytes. *J Cell Sci.* 1981;51:173-88.
- 23 Pira E. Biological effects of exposure to electromagnetic fields: introduction. *G Ital Med Lav Ergon.* 2003;25:362-3.
- 24 Roy S, Noda Y, Eckert V, Traber MG, Mori A, Liburdy RP, et al. The phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) induced oxidative burst in rat peritoneal neutrophils is increased by a 0.1mT (60 Hz) magnetic field. *FEBS Lett.* 1995;376:164-6.
- 25 Simko M, Droste S, Kriehuber R, Weiss DG. Stimulation of phagocytosis and free radical production in murine macrophages by 50 Hz electromagnetic fields. *Eur J Cell Biol.* 2001;80:562-6.

## Referências (cont.)

---

- 26 Tokalov SV, Gutzeit HO. Weak electromagnetic fields (50 Hz) elicit a stress response in human cells. *Environ Res.* 2004;94:145-51.
- 27 Lacy-Hulbert A, Metcalfe JC, Hesketh R. Biological responses to electromagnetic fields. *Faseb J.* 1998;12:395-420.
- 28 Liyama M, Shimada Y, Kita T, Ito H. Effect of aging on macrophage adherence to extracellular matrix proteins. *Mech Ageing Dev.* 1992;66:149-58.
- 29 Tenforde TS. The wonders of magnetism. *Bioelectromagnetics.* 2003;24:3-11.
- 30 Karimi K, Lennartz MR. Protein kinase C activation precedes arachidonic acid release during IgG-mediated phagocytosis. *J Immunol.* 1995;155:5786-94.
- 31 Papadimitriou JM, van Bruggen I. The effects of malnutrition on murine peritoneal macrophages. *Exp Mol Pathol.* 1988;49:161-70.
- 32 Takeda E, Takata K, Yamahaka H, Taketami Y, Morita K, Miyamoto K, et al. Vitamin D3 elicits calcium response and activates blood monocyte-derived macrophages from patients with vitamin D dependent rickets type II. *FEBS Lett.* 1996;396:157-60.
- 33 Twining SS, Schulte DP, Wilson PM, Fish BL, Moulder JE. Vitamin A deficiency alters rat neutrophil function. *J Nutr.* 1997;127(4):558-65.
- 34 Moore SE, Goldblatt D, Bates CJ, Prentice AM. Impact of nutritional status on antibody responses to difference vaccines in undernourished Gambian children. *Acta Paediatr.* 2003;92:170-6.
- 35 Flipo D, Fournier M, Benquet C, Roux P, Le Bouliaire C, Pinsky C, et al. Increased apoptosis, changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> and functional alterations in lymphocytes and macrophages after in vitro exposure to static magnetic field. *J Toxicol Environ Health.* 1998;54:63-76.
- 36 Valentina GS, Gabdoulkhakova AG, Santalov BF. Immunomodulating action of low intensity millimeter waves on primed neutrophils. *Bioelectromagnetics.* 2002;23:599-606.
- 37 Krieger JA, Born JL, Burchiel SW. Persistence of calcium elevation in the HPB-All human T cell line correlates with immunosuppressive properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1994;127:268-74.
- 38 Carson JJ, Prato FS, Drost DJ, Diesbourg LD, Dixon SJ. Time-varying magnetic fields increase cytosolic free calcium in cell HL-60 cells. *Am J Physiol.* 1990;28:687-92.
- 39 Parod RJ, Brain JD. Uptake of latex particles by pulmonary macrophages: role of calcium. *Am J Physiol.* 1983;14:227-34.
- 40 Safronova VG, Gabdoulkhakova AG, Santalov BF. Immunomodulating action of low intensity millimeter waves on primed neutrophils. *Bioelectromagnetics.* 2002;23:599-606.